



**Università degli Studi di Bologna**

---

**Dottorato di Ricerca in Scienze Morfologiche  
Umane e Molecolari**

**MED/03 GENETICA MEDICA**

**DNA EMBRIO-FETALE NEL SANGUE MATERNO  
NEL PRIMO TRIMESTRE DI GRAVIDANZA**

Tesi di Dottorato di Ricerca  
presentata da:

**Dr.ssa Lucia Capone**

Coordinatore

**CHIAR.MO PROF L. COCCO**

Relatore

**CHIAR.MO PROF. A. FORABOSCO**

**XIX CICLO**

---

*ANNO ACCADEMICO 2005-2006*

## **RINGRAZIAMENTI**

Desidero ringraziare, prima di tutti, il Professor A. Forabosco per avermi dato l'opportunità di svolgere questa ricerca, per il sostegno datomi nel corso di tutto il periodo del Dottorato e per le preziose indicazioni con le quali ha guidato e continua a guidare me e i miei colleghi.

Ringrazio fortemente l'Associazione Cante di Montevercchio di Fano che mi ha "finanziata" in tutti questi anni.

Un caloroso ringraziamento va ai miei colleghi e maestri che mi hanno supportata in questi anni: in particolare un grazie speciale a Roberto, Ilaria, Luigia e Luca.

Ringrazio i miei amici, in particolare le mie amiche Elena, Michela e Ilaria che mi hanno pazientemente sopportata.

Ringrazio i miei genitori e i miei fratelli per il sostegno che ancora adesso continuano a darmi e in ultimo, ma certamente non per importanza, ringrazio il mio fidanzato per avermi costantemente incoraggiata, per avere sempre creduto in me e per avere illuminato la mia vita.

# INDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	
1.1	<i>Diagnosi genetica prenatale invasiva e non invasiva</i>	pag. 4
1.2	<i>Le cellule fetali nel sangue materno</i>	pag. 5
1.3	<i>Rilevamento di acidi nucleici liberi nella circolazione</i>	pag. 12
1.4	<i>DNA embrio-fetale libero nel sangue materno</i>	pag. 14
<b>2</b>	<b>SCOPO</b>	
2.1	<i>Scopo della tesi</i>	pag. 23
<b>3</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	
3.1	<i>Raccolta e preparazione dei campioni</i>	pag. 24
3.2	<i>Messa a punto dell'estrazione del DNA dal siero</i>	pag. 24
3.3	<i>Estrazione del DNA da siero</i>	pag. 25
3.4	<i>Progettazione della sonda</i>	pag. 25
3.5	<i>Analisi del gene per la progettazione dei primers</i>	pag. 28
3.6	<i>Rilevamento di sequenze Y specifiche mediante PCR quantitativa</i>	pag. 30
3.7	<i>Analisi di delezione dei geni DAZ</i>	pag. 42
3.8	<i>Verifica della sensibilità di reazione</i>	pag. 42
3.9	<i>Verifica della specificità di reazione</i>	pag. 42
3.10	<i>Allestimento della reazione di amplificazione</i>	pag. 43
3.11	<i>Curva di diluizione</i>	pag. 43
3.12	<i>Analisi della casistica di 57 donne gravide</i>	pag. 44
3.13	<i>Analisi statistica</i>	pag. 44
3.14	<i>Misure di anticontaminazione</i>	pag. 45
<b>4</b>	<b>RISULTATI</b>	
4.1	<i>Messa a punto dell'estrazione del DNA dal siero</i>	pag. 47
4.2	<i>Verifica della sensibilità della reazione</i>	pag. 48
4.3	<i>Verifica della specificità di primers e sonda</i>	pag. 49
4.4	<i>Analisi di delezione del gene DAZ</i>	pag. 50
4.5	<i>Definizione del sesso fetale e quantificazione del DNA embrio-fetale tramite Real Time PCR</i>	pag. 51
<b>5</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	pag. 57
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	pag. 62
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 64

# 1. INTRODUZIONE

## *1.1 Diagnosi genetica prenatale invasiva e non invasiva*

La diagnosi genetica prenatale consiste nell'insieme delle procedure finalizzate a valutare la presenza di anomalie a carico del feto.

La diagnosi prenatale può essere realizzata sia attraverso metodiche invasive, sia attraverso metodiche non invasive. Le metodiche invasive consistono in funicolocentesi, villocentesi e amniocentesi. Le principali metodiche non invasive invece comprendono l'ecografia, l'eco-doppler, il Tri-test e la translucenza nucale. Sebbene queste ultime siano estremamente utili nel monitoraggio della gravidanza, esse risultano del tutto inadeguate per la diagnosi di molte malattie di origine genetica (sia cromosomiche, sia monogeniche), per le quali l'unica possibilità di diagnosi è rappresentata dalle tecniche invasive (Goldberg, 1997).

La diagnosi prenatale invasiva attraverso amniocentesi e villocentesi ha avuto inizio alla fine degli anni 60 e negli anni 80 del 1900 rispettivamente. Nel corso dei decenni queste tecniche sono state estremamente raffinate, sia per una maggiore preparazione del personale sia come conseguenza dei notevoli avanzamenti tecnologici, riducendo al minimo il rischio di aborto successivo al prelievo. Purtroppo però il rischio di aborto non è stato del tutto azzerato e attualmente è valutato attorno al 0.5-1%. Per questo motivo, e per il fatto che tali procedure sono estremamente costose, la diagnosi prenatale non invasiva è rivolta verso un gruppo ristretto di donne. In particolare essa è rivolta nei confronti delle donne che abbiano o abbiano superato i 35 anni di età, dal momento che dopo i 35 anni aumenta drasticamente il rischio di avere un figlio affetto da anomalie cromosomiche, e tale rischio è del tutto sovrapponibile al

rischio di aborto correlato alle metodiche stesse. Sebbene l'età materna avanzata sia indicativa di un aumentato rischio generico di malattia cromosomica, in realtà anche le donne al di sotto dei 35 anni possono avere bimbi affetti: si stima che l'80% dei neonati affetti da sindrome di Down nasca da donne con meno di 35 anni, alle quali non viene gratuitamente offerta la possibilità di diagnosi prenatale invasiva, essendo il rischio di perdere il feto in seguito al prelievo maggiore rispetto al rischio di avere un feto Down. Se fosse possibile ottenere materiale fetale su cui condurre l'indagine genetica, senza invadere l'utero in alcun modo, la diagnosi genetica prenatale potrebbe essere offerta a tutte le donne gravide, indipendentemente dal loro rischio di avere un figlio affetto. E' per questo motivo che già da numerosi anni è cresciuto l'interesse per la messa a punto di tecniche per una diagnosi prenatale non invasiva. Tali tecniche si basano sul recupero di materiale genetico fetale dal sangue materno, sia sottoforma di cellule fetali sia sottoforma di acidi nucleici fetali.

### *1.2 Le cellule fetali nel sangue materno*

La scoperta della presenza delle cellule fetali nella circolazione materna risale al 1893 per opera del patologo tedesco Schmorl che ha descritto la presenza di cellule del trofoblasto nella circolazione polmonare di 14 donne gravide decedute per eclampsia (Schmorl, 1953). Nel 1957 sono stati isolati dalla circolazione materna eritrociti di origine fetale (Klinhauer et al., 1957) e dieci anni più tardi, grazie all'identificazione di metafasi con cariotipo XY, sono stati ritrovati leucociti fetali nel sangue periferico di donne gravide portatrici di un feto maschio (Walknowska et al., 1969). Tali scoperte hanno costituito la prima dimostrazione che le cellule del trofoblasto non sono l'unica componente cellulare fetale riscontrabile nel sangue materno; ciò nonostante per molti anni l'esistenza delle cellule fetali nella circolazione materna è stata considerata controversa e la prova definitiva della loro reale presenza si è avuta solo con l'introduzione

di tecniche analitiche più sensibili, quali l'ibridazione in *situ* fluorescente (FISH) e l'amplificazione del DNA tramite PCR. Sebbene attualmente sia unanimemente riconosciuta la presenza delle cellule fetali nel sangue materno, i dati relativi alla loro frequenza sono fortemente discordanti dal momento che risulta molto complicato isolarle, sia a causa della loro scarsità, sia a causa della loro fragilità, per cui un certo numero viene perso durante i vari *steps* del processo di isolamento.

Impiegando la tecnica di ibridazione in *situ* fluorescente e l'amplificazione tramite PCR di sequenze specifiche del cromosoma Y, Hamada e collaboratori hanno dimostrato la presenza di circa una cellula fetale ogni 100.000 cellule materne nel primo trimestre di gravidanza e circa una cellula fetale ogni 10.000 cellule materne nel terzo trimestre di gravidanza (Hamada et al., 1993). Tale dato è stato ulteriormente confermato da Krabchi e colleghi, che, sempre attraverso l'utilizzo dell'ibridazione in *situ* fluorescente, hanno riportato la presenza di circa 2-6 cellule fetali per millilitro di sangue materno (Krabchi et al., 2001). Questi numeri sono del tutto paragonabili a quelli ottenuti attraverso saggi quantitativi tramite PCR *real time*, che si aggirano attorno a 1-4 cellule fetali per ogni millilitro di sangue materno (Bianchi et al., 1997; Ariga et al., 2001). Altri gruppi non sono riusciti a confermare questi dati, isolando un numero ancora inferiore di cellule o addirittura non isolando alcuna cellula (Ganshirt-Ahlert et al., 1992; Busch et al., 1994a, 1994b; Durrant et al., 1996; Mavrou et al., 2007).

Numerosi studi hanno evidenziato un aumento del numero di cellule fetali nella circolazione materna in presenza di complicazioni della gravidanza, come diabete e preeclampsia (Bianchi, 1995; Chua et al., 1991; Ganshirt et al., 1994; Holzgreve et al., 1998; Zhong et al., 2006; Troeger et al., 2006) e in caso di feti con aneuploidie, facendo pensare all'utilizzo delle cellule fetali anche nel monitoraggio delle gravidanze. In particolare Bianchi e colleghi hanno stimato un aumento di circa sei volte nel numero di cellule fetali identificate nel

sangue di donne gravide portatrici di un feto con sindrome di Down e simili risultati sono stati descritti da altri gruppi, anche in riferimento ad altre aneuploidie, comprese quelle che interessano i cromosomi sessuali (Bianchi et al., 1997, 2002; Farina and Bianchi, 1998; Falcidia et al., 2004; Krabchi et al., 2006). Questi fenomeni possono trovare spiegazione nel fatto che una placentazione imperfetta, come quella che si riscontra in presenza di preeclampsia e aneuploidie del feto, determina un'alterazione della barriera placentare, con conseguente aumento del trasferimento di cellule fetali nella circolazione materna (Holzgreve et al., 1998; Al-Mufti et al., 2000a, 2000b). Altri fattori che influenzano la concentrazione delle cellule fetali nel sangue materno sono l'epoca gestazionale (Hamada et al., 1993; Liou et al., 1993; Bianchi et al., 1997; Guetta et al., 2004), le gravidanze multiple, l'incompatibilità del gruppo sanguigno fetale con quello materno e il precedente ricorso a procedure invasive (Jansen et al., 1997).

A causa della loro rarità tutti i tentativi fatti fino ad ora per isolare e analizzare le cellule fetali sono stati finalizzati a separarle dalle cellule materne o ad arricchire il sangue materno per la componente cellulare fetale per aumentarne la proporzione relativa. Numerosi sono gli approcci valutati allo scopo di definire quello più idoneo al recupero delle cellule fetali dal sangue materno. Essi includono la centrifugazione su gradiente di densità, biglie immunomagnetiche, inibizione dell'anidrasi carbonica, colonne coniugate ad avidina con anticorpi biotinilati, micromanipolazione di singole cellule, FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) e MACS (*Magnetic Activated Cell Sorter*). Sia la tecnica FACS che quella MACS si basano principalmente sul riconoscimento delle cellule fetali attraverso reazioni antigene-anticorpo, in cui gli anticorpi sono coniugati rispettivamente a fluorocromi o a microbiglie magnetiche. In generale con la FACS l'analisi viene fatta tenendo conto anche di parametri fisici della cellula come il volume o la dimensione. Tuttavia questa procedura è molto laboriosa e costosa, per cui molti gruppi

preferiscono utilizzare la MACS, che è meno costosa e più rapida. Inoltre da uno studio multicentrico è emerso che la MACS permette di recuperare un maggior numero di cellule fetali rispetto alla FACS (Bianchi et al., 2002). Basandosi sull'utilizzo di anticorpi, il successo della FACS e della MACS dipende dalla specificità dell'anticorpo utilizzato. L'anticorpo più comunemente usato è l'anti CD71, che riconosce il recettore di superficie della transferrina, che è espresso su quasi tutte le cellule ematiche nucleate fetali del primo trimestre (Zheng et al., 1997). La sua espressione decresce con l'epoca gestazionale ma aumenta nei feti con aneuploidie cromosomiche. Il principale svantaggio è che si esprime anche sulla superficie di una sottopopolazione di cellule materne, per cui il grado di purezza delle cellule isolate utilizzando solo l'anticorpo anti CD71 non è elevato (Bianchi et al., 1994; Zheng et al., 1997). Altri anticorpi utilizzati sono gli anticorpi anti CD36 (contro il recettore della trombospodina), quelli anti glicoforina A, quelli contro gli antigeni dei gruppi sanguigni I/i e gli anticorpi FB3-2, 2-6B/6 e H3-3, ma nessuno singolarmente rappresenta l'anticorpo ottimale in grado di isolare efficacemente le cellule fetali. Ampiamente utilizzati sono gli anticorpi diretti verso le globine embrionali e fetali. La  $\zeta$ -globina e la  $\epsilon$ -globina, pur essendo marcatori specifici dell'embrione, sono espresse solamente per un breve periodo gestazionale. La  $\zeta$ -globina diminuisce drasticamente già dopo la sesta-settima settimana di gestazione mentre la  $\epsilon$ -globina già alla dodicesima settimana è presente solo in metà delle cellule ematiche nucleate dell'embrione (Mesker et al., 1998; Choolani et al., 2003). Per quanto riguarda le globine fetali invece, la  $\gamma$ -globina ha il vantaggio di essere prodotta dagli eritrociti fetali per un ampio periodo della gravidanza, ma il suo impiego risulta in una maggiore contaminazione da parte delle cellule materne, poiché essa è espressa anche in una frazione di eritrociti dell'adulto (Zheng et al., 1995). Da tutto ciò si evince che, fatta eccezione per le globine embrionali, fino ad oggi non è ancora stato trovato un antigene specifico solo per le cellule fetali, così che risulta



ancora estremamente difficile isolare le cellule fetali senza contaminazione materna. Una strategia utilizzata per ridurre almeno in parte il problema della contaminazione materna consiste nella deplezione selettiva delle cellule materne, ricorrendo all'impiego di tecniche che si basano sull'utilizzo di anticorpi specifici per le cellule dell'adulto, come gli anticorpi contro gli antigeni CD45, CD3, CD19, CD13 e CD14.

Attualmente la strategia adottata più frequentemente per isolare le cellule fetali consiste nell'utilizzo combinato di più di una di queste procedure appena descritte, anche se rimane aperta la questione se questa sia la strada giusta da seguire, dal momento che, come già detto in precedenza, le cellule fetali sono molto fragili e quindi più è elevato il numero di manipolazioni che subiscono, maggiore è il numero di cellule che viene perso.

Il problema della rarità delle cellule fetali potrebbe essere superato attraverso la messa in coltura delle cellule fetali isolate, in modo da ottenerne un numero sufficiente per l'analisi genetica. Sebbene siano riportati studi discordanti a questo riguardo, alcune ricerche hanno dimostrato la possibilità di espandere in vitro sia le cellule del trofoblasto, sia i leucociti fetali (Eridani et al., 1998; Jansen et al., 2000; Guetta et al., 2003, 2005). Al momento però risulta difficile confermare l'utilità di questa strada, proprio per l'incapacità da parte di tutti i gruppi di riprodurre tali risultati, per cui si rendono necessari ulteriori studi in questa direzione.

Nella circolazione materna sono stati isolati tre tipi principali di cellule fetali: le cellule del trofoblasto, i leucociti e gli eritroblasti.

Il tipo cellulare d'elezione dovrebbe presentare tre requisiti:

- essere predominante nella circolazione materna nel primo trimestre di gravidanza,
- avere una vita media limitata nel sangue materno,
- possedere caratteristiche morfologiche distinguibili dalle cellule materne.

Le cellule del trofoblasto hanno una morfologia che ne consente

un'inequivocabile identificazione al microscopio. Sono rilasciate nel sangue materno durante il primo trimestre di gravidanza, quindi si ritrovano precocemente ed inoltre è possibile coltivarle in vitro; tuttavia non sono facilmente isolabili nelle gravidanze normali dal momento che vengono rapidamente catturate dalla circolazione polmonare (Sargent et al., 1994). In più la natura multinucleata e l'origine placentare che le caratterizza ne limita il loro utilizzo per la diagnosi citogenetica del feto. La natura multinucleata infatti rende difficile l'interpretazione dei segnali di fluorescenza in un'analisi di FISH, l'origine placentare invece comporta un rischio pari all'1% di ottenere un cariotipo non rappresentativo del feto, a causa del fenomeno del mosaicismo placentare (Bianchi, 1999).

I leucociti rappresentano il primo tipo di cellule fetali isolate con successo dal sangue materno da Herzenberg e collaboratori (Herzenberg et al., 1979), tramite separazione a fluorescenza basata sulla differenza tra madre e feto per gli antigeni HLA; tuttavia questo approccio non è universalmente applicabile, poiché presuppone una coppia informativa relativamente ai polimorfismi HLA, nonché una paternità nota. Sebbene i leucociti abbiano la potenzialità di proliferare in vitro, permettendo di superare i limiti legati alla loro rarità, il loro impiego per le indagini genetiche non è consigliato dal momento che possono persistere nella circolazione materna anche fino a 27 anni dopo il parto (Bianchi et al., 1996). Infatti questa condizione di microchimerismo potrebbe causare, in una multigravida, un errore diagnostico, poiché esiste il rischio che i leucociti selezionati non appartengano alla gravidanza in corso (Schroder et al., 1974; Ciaranfi et al., 1977; Bianchi et al., 1996).

Gli eritroblasti fetali sembrerebbero i candidati ideali, dal momento che sono cellule mononucleate e con una breve emivita, caratteristica questa che elimina il rischio di microchimerismi. La prima separazione della componente eritrocitaria dal sangue materno risale al 1990, quando Bianchi e collaboratori (Bianchi et al., 1990) hanno sfruttato l'espressione del recettore della transferrina (CD71) sulla

superficie di tali cellule, per selezionarle tramite la metodologia FACS. L'utilizzo degli eritroblasti come bersaglio della selezione non è tuttavia privo di problemi, poiché l'iniziale teoria a sostegno della rarità dell'origine materna di queste cellule è stata smentita da numerose evidenze, a riprova che la maggior parte degli NRBC selezionati non sono di origine fetale (Slunga-Tallberg et al., 1995; Sohda et al., 1997; Little et al., 1997; Von Eggeling et al., 1997); anzi studi recenti hanno dimostrato che gli eritroblasti fetali costituiscono solo una piccola frazione delle cellule fetali presenti nel sangue materno (Kølvraa et al., 2005). A tutto questo si aggiunge il fatto che a causa del loro stato altamente differenziato o apoptotico, è estremamente difficile, se non impossibile, coltivarli in vitro.

Nel sangue fetale sono state identificate anche cellule staminali mesenchimali appartenenti al feto (Campagnoli et al., 2001) che sono state immediatamente prese in considerazione come bersaglio per la diagnosi prenatale non invasiva, sia perché compaiono precocemente, a partire dalla settima settimana di gestazione, sia perché hanno una morfologia e un immunofenotipo caratteristici. Purtroppo però i tentativi fatti al fine di isolarle hanno dimostrato che anche queste cellule sono estremamente rare nella circolazione materna, escludendo la possibilità di un loro utilizzo nella diagnosi prenatale non invasiva (O'Donoghue et al., 2003).

Nonostante fino ad ora siano stati riportati numerosi casi di diagnosi prenatale non invasiva utilizzando vari tipi di cellule fetali su un campione relativamente piccolo di donne gravide, i risultati di studi condotti su una casistica più ampia sembrerebbero contrastare l'ottimismo degli studi più piccoli, che spesso mancano di ulteriori conferme, precludendo almeno per il momento un utilizzo *routinario* delle cellule fetali nella diagnosi prenatale non invasiva.

### *1.3 Rilevamento di acidi nucleici liberi nella circolazione*

La scoperta della presenza di acidi nucleici liberi nel plasma di soggetti sani e malati risale al 1948 grazie a Mandel e Métais (Mandel et al., 1948). Questa scoperta è avvenuta pochi anni dopo la dimostrazione che il DNA è la molecola contenente l'informazione genetica (1944), e addirittura ha preceduto la determinazione della struttura a doppia elica del DNA da parte di Watson e Crick (1953). A partire dagli anni '60 del 1900 sono cominciati i primi studi relativi agli acidi nucleici liberi nella circolazione sanguigna. Inizialmente sono stati concentrati verso le malattie autoimmunitarie. Nel 1966 e nel 1977 rispettivamente è stata dimostrata la presenza di elevate quantità di DNA circolante libero nel siero di pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico (Tan et al., 1966) e di pazienti affetti da artrite reumatoide (Leon et al., 1977a). Contemporaneamente nello stesso anno è stato dimostrato un aumento della concentrazione del DNA libero circolante nel siero dei pazienti affetti da cancro; si è dimostrato inoltre che tale concentrazione è maggiore in presenza di metastasi e, in alcuni casi, i livelli diminuiscono nei pazienti trattati con un'efficace terapia antitumorale (Leon et al., 1977b). A causa delle limitate tecnologie di quegli anni, tuttavia, non è stato possibile determinare la precisa origine cellulare del DNA libero nei pazienti affetti da tumori. Soltanto a partire dalla fine degli anni novanta del 1900 è stato possibile dimostrare che il DNA tumorale è presente in frammenti che mostrano lunghezze multiple del DNA nucleosomale, il che indica che tale DNA deriva da cellule tumorali che muoiono per apoptosi (Giacona et al., 1998; Jahr et al., 2001): quindi il DNA tumorale libero deriva dalle cellule tumorali che muoiono per apoptosi.

La potenzialità della scoperta del DNA tumorale libero nei confronti di nuove prospettive riguardo all'individuazione e al monitoraggio dei tumori è divenuta chiara nel 1989 quando Stroun e

collaboratori (Stroun et al., 1989) hanno osservato che il DNA libero riscontrato nei pazienti con il cancro presentava le caratteristiche tipiche del DNA tumorale. Tale osservazione è stata ulteriormente confermata nel 1994, quando due gruppi di ricercatori hanno individuato mutazioni in oncogeni nel plasma di pazienti affetti da mielodisplasia, leucemia mieloide acuta (Vasioukhin et al., 1994) e cancro al pancreas (Sorenson et al., 1994). Nel 1996 due studi hanno riportato contemporaneamente la presenza di alterazioni di microsatelliti, perdita di eterozigosità (LOH: *Loss Of Heterozygosity*) e instabilità, associate a tumori nel plasma e siero dei pazienti con neoplasie (Chen et al., 1996; Nawroz et al., 1996). Fino ad oggi sono state riscontrate molte altre alterazioni genetiche, tra cui mutazioni (Anker et al., 1997; Hibi et al., 1998) e amplificazioni di oncogeni (Chiang et al., 1999). Sono state rilevate anche alterazioni epigenetiche, come l'ipermetilazione del DNA, causa di silenziamento genico. In molte neoplasie geni oncosoppressori, geni codificanti proteine di riparazione, geni codificanti inibitori di metastasi subiscono ipermetilazione. Le alterazioni, sia genetiche sia epigenetiche, rappresentano, pertanto, biomarcatori molecolari valutabili nel plasma e nel siero: il loro rilevamento è di grande importanza nel settore dell'oncologia tra le popolazioni ad alto rischio, poiché fornirà strumenti per la diagnosi non invasiva di cancro, per il monitoraggio e per la prognosi della malattia.

In seguito a tali scoperte, l'interesse di molti ricercatori si è rivolto alla ricerca di altri tipi di DNA presenti nel plasma e nel siero. Il DNA virale è stato ampiamente studiato in quanto alcuni virus sono causa di sviluppo e progressione neoplastica, quindi esso rappresenta un marcatore specifico per tumori a causa virale. (Lo et al., 2001; Mutirangura et al., 1998; Capone et al., 2000). In letteratura sono riportati studi riguardo la valutazione e quantificazione di differenti DNA virali, i più rappresentati dei quali sono il virus di Epstein-Barr e il papillomavirus (Lo et al., 2001).

La scoperta di DNA tumorale e virale nel plasma e nel siero

dei pazienti ha indotto i ricercatori ad indagare anche sull'eventuale presenza di DNA fetale nella circolazione di donne gravide, alla luce di alcuni studi che dimostrano che i trofoblasti della placenta presentano caratteristiche paragonabili alle cellule tumorali (Strickland and Richards, 1992).

#### *1.4 DNA embrio-fetale libero nel sangue materno*

Il primo studio sul DNA fetale estratto da sangue materno *in toto* è stato effettuato da Lo e colleghi allo scopo di determinare il sesso fetale, amplificando tramite *nested* PCR sequenze ripetute Y-specifiche presenti nel feto ma non nella madre (Lo et al., 1989).

Una sorgente di materiale alternativa al sangue materno intero è costituita dai siero e plasma materni nei quali il *background* del DNA materno è minore rispetto al sangue *in toto* e la quantità di DNA fetale è molto maggiore. La presenza del DNA embrio-fetale libero nel plasma e nel siero materni durante la gravidanza è stata dimostrata per la prima volta nel 1997 (Lo et al., 1997) sempre tramite amplificazione in *nested* PCR di sequenze Y-specifiche in 43 donne gravide prima di effettuare l'amniocentesi o prima del parto. Sequenze Y-specifiche sono state rilevate nell'80% e nel 70% rispettivamente dei campioni di plasma e siero di donne portatrici di un feto maschio.

Saggi di *real time* PCR quantitativa hanno dimostrato che il DNA embrio-fetale libero rappresenta circa il 3,4% del DNA libero plasmatico (con valori che oscillano tra lo 0,39 e l'11,9%) in epoca gestazionale precoce (11-17 settimane di gestazione) e circa il 6,2% (con valori che oscillano tra lo 2,33 e l'11,4%) in epoca gestazionale avanzata (37-43 settimane di gestazione) (Lo et al., 1998). Gli stessi studi inoltre hanno dimostrato che la concentrazione media di DNA embrio-fetale libero nel plasma/siero materni è rispettivamente il 21,2 e il 23,9 volte più elevata rispetto al DNA embrio-fetale dovuto alla componente cellulare rispetto alla medesima settimana di gestazione

(Lo et al., 1998). Questa scoperta, insieme alla scoperta che il DNA embrio-fetale libero viene rapidamente degradato dalla circolazione materna quasi immediatamente dopo il parto, con una emivita media di 16,3 minuti (Lo et al., 1999d), ha fatto pensare al DNA embrio-fetale come a un candidato ideale per lo sviluppo di nuove strategie di diagnosi prenatale non invasiva, dal momento che permette di superare almeno in parte i limiti legati alle cellule fetali, ovvero la scarsità e la permanenza nella circolazione materna anche per decenni dopo il parto.

Studi sull'andamento quantitativo del DNA embrio-fetale libero durante la gravidanza hanno permesso di evidenziare come la sua concentrazione aumenti progressivamente con il procedere della gravidanza, subendo addirittura un incremento medio del 29,3% ogni settimana del terzo trimestre per raggiungere un incremento massimo finale immediatamente prima del parto (Chan et al., 2003).

Un acceso dibattito e' ancora in corso riguardo l'origine del DNA embrio-fetale. L'ipotesi che attualmente riscuote maggiori consensi suggerisce un'origine placentare, dovuta all'apoptosi dei sinciziotrofoblasti costantemente rimpiazzati sulla superficie della placenta (Hahn et al., 2005; Tjoa et al., 2006). A supporto di tale ipotesi esistono almeno tre evidenze:

1. assenza di DNA embrio-fetale libero nella circolazione materna in casi di mosaicismo placentare (Flori et al., 2004)
2. presenza di DNA embrio-fetale libero nella circolazione materna anche dopo il parto quando una parte della placenta non viene espulsa ma viene trattenuta (Jimbo et al., 2003)
3. rilevamento nella circolazione materna di sequenze fetali con *patterns* di metilazione specifici della placenta (Chim et al., 2005; Chan et al., 2006.)

Secondo un'altra ipotesi il DNA embrio-fetale libero avrebbe origine dall'apoptosi delle cellule fetali nella circolazione materna (Chan et al., 2004). Sebbene teoricamente possibile, le cellule fetali, a causa della loro scarsità nella circolazione materna, non possono

spiegare le elevate quantità di DNA embrio-fetale libero. Infine è possibile ipotizzare un passaggio diretto del DNA embrio-fetale dai compartimenti fetali alla circolazione materna. Infatti nel liquido amniotico sono state rinvenute elevate quantità di DNA embrio-fetale che potrebbero fornire un gradiente di concentrazione necessario per il trasferimento passivo nella circolazione materna (Bianchi et al., 2001).

La prima strategia messa a punto per l'identificazione del DNA embrio-fetale si è basata sul rilevamento di sequenze assenti nel genoma materno, come le sequenze Y-specifiche, prima attraverso tecniche di *nested* PCR poi attraverso *real time* PCR, per avere anche un profilo quantitativo nelle varie epoche gestazionale. Pertanto la prima applicazione in cui il DNA embrio-fetale libero ha trovato impiego è stata la determinazione del sesso fetale, di particolare importanza nella gestione delle malattie *X-linked*. Per le donne gravide portatrici di un feto a rischio per una malattia *X-linked*, infatti, conoscere il sesso del feto permette di procedere con il prelievo dei villi coriali per individuare il difetto genetico solo nei feti maschi e di non procedere invece nell'eventualità che il feto risulti femmina. In questo caso il feto al massimo sarà portatore della malattia, per cui la villocentesi non è necessaria e può essere evitata, evitando soprattutto il rischio di aborto legato all'invasività della procedura.

Un'altra applicazione della determinazione del sesso fetale attraverso l'utilizzo del DNA embrio-fetale libero riguarda le gravidanze a rischio per la sindrome adrenogenitale, dovuta al deficit dell'enzima 21-idrossilasi. Il deficit a carico di questo enzima causa una produzione abnorme di androgeni con conseguente virilizzazione in utero dei feti femmina. Per questo motivo alle donne gravide vengono somministrati corticosteroidi che però hanno molti effetti collaterali. Grazie alla determinazione del sesso fetale è possibile evitare la terapia nei casi di feto maschio, riducendo pertanto gli effetti collaterali legati alla terapia (Rijnders et al., 2001, 2004; Chiu et al., 2002a; Bartha et al., 2003).



Tra le prime applicazioni del DNA embrio-fetale libero basate sul rilevamento di sequenze fetali assenti nel genoma materno, ma non Y-specifiche, di notevole rilievo clinico è la determinazione non invasiva del genotipo RhD fetale in donne gravide RhD negative. L'amplificazione di sequenze specifiche del gene RhD nel plasma/siero di donne RhD negative permette di stabilire la presenza di un feto RhD positivo e quindi le gravidanze a rischio di sensibilizzazione contro l'antigene D, da sottoporre a un'adeguata profilassi con immunoglobuline anti-D. Grazie alla sua elevata accuratezza questa tecnica è stata introdotta come servizio di routine dal *British National Blood Service* già dal 2001 (Finning et al., 2002, 2004), rappresentando il primo caso di un uso routinario del DNA embrio-fetale libero per la diagnosi prenatale non invasiva.

L'utilizzo del DNA embrio-fetale libero come mezzo per la diagnosi prenatale non invasiva di malattie genetiche fino ad ora è stato fortemente limitato dall'elevato *background* di DNA materno, a causa del quale è possibile rilevare solamente mutazioni ereditate per via paterna. Infatti sebbene sia stato possibile fare diagnosi di malattie autosomiche dominanti come l'acondroplasia, la distrofia miotonica e la corea di Huntingtons (Saito et al., 2000; Li et al., 2004b; Gonzalez-Gonzalez et al., 2003a, 2003b; Amicucci et al., 2000), rilevando nel plasma/siero materni la mutazione trasmessa dal padre al feto, lo stesso non è stato possibile per le malattie autosomiche recessive. In questo caso non è possibile confermare la malattia, perché rilevare la mutazione paterna non permette di escludere la presenza di una eventuale mutazione materna. I saggi di amplificazione allele-specifica progettati per rilevare la mutazione paterna potrebbero effettivamente permettere di escludere la presenza di una malattia autosomica recessiva solo se si dimostrasse che essi sono altamente sensibili e specifici e quindi che la mancata amplificazione dell'allele paterno è dovuta all'assenza dell'allele stesso e non alla incapacità di rilevarlo. In questo caso sarebbe possibile fare una diagnosi per esclusione (Chiu et al., 2002b): non essendo rilevata la mutazione

paterna il feto può risultare al massimo portatore della malattia. In letteratura sono riportati numerosi studi di questo tipo finalizzati alla diagnosi di esclusione di malattie autosomiche recessive come la beta-talassemia, la fibrosi cistica e le emoglobinopatie (Chiu et al., 2002b; Gonzalez-Gonzalez et al., 2002; Fucharoen et al., 2003, Nasis et al., 2004). In alternativa per escludere la sindrome adrenogenitale. Chiu e colleghi hanno amplificato dal DNA fetale nel plasma materno un pannello di marcatori polimorfici associati all'allele paterno non mutato (Chiu et al., 2002a). L'introduzione di questo accorgimento purtroppo rappresenta un elemento di complessità che ne sfavorisce l'impiego per applicazioni *routinarie*.

L'elevato *background* materno tende a mascherare gli alleli fetali rendendo ancora più difficile il rilevamento degli alleli mutati che differiscono per lo più per poche basi rispetto agli alleli materni. Recentemente però è stato dimostrato che la maggior parte del DNA embrio-fetale libero ha dimensioni minori rispetto al DNA materno: in particolare circa il 70% del DNA embrio-fetale possiede dimensioni inferiori a 300pb, mentre circa il 75% del DNA materno ha dimensioni maggiori a 300pb. (Li et al., 2004a; Chan et al., 2004, Hromadnikova et al., 2006). Sulla base di questa scoperta pertanto è possibile concentrare il DNA embrio-fetale selezionando i frammenti di DNA inferiori a 300pb, migliorando notevolmente la capacità di discriminare gli alleli fetali mutati da quelli materni non mutati (Li et al., 2004a, 2005).

Uno studio del 2004 ha messo in evidenza come attraverso la tecnica di spettrometria di massa MALDI TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*) siano facilmente rilevabili nel plasma/siero materni gli alleli fetali mutati, nonostante l'elevata contaminazione da parte del DNA della madre (Ding et al., 2004). Gli autori dello studio hanno dimostrato che la MALDI TOF MS presenta una elevata sensibilità di rilevamento delle mutazioni puntiformi a carico del DNA embrio-fetale libero, sia quando viene associata al protocollo standard hME (*Homogenous MassExtend*), in

cui si ha estensione sia dell'allele fetale mutato sia di quello materno normale, sia quando viene associata al protocollo modificato SABER (*Single Allele Base Extension Reaction*), in cui viene selettivamente esteso l'allele fetale mutato. In particolare in quest'ultimo caso la sensibilità di rilevamento risulta maggiore perché l'amplificazione preferenziale della sequenza fetale mutata vanifica l'effetto mascherante del *background* materno, che invece è fortemente presente utilizzando il protocollo standard. Quando invece viene impiegato il DNA embrio-fetale concentrato, cioè selezionato per dimensioni inferiori a 300pb, la sensibilità di rilevamento degli alleli mutati del protocollo standard aumenta enormemente, soprattutto in epoca gestazionale precoce, passando dal 47 al 100% di rilevamento. Utilizzando DNA embrio-fetale concentrato la sensibilità di rilevamento del protocollo SABER non aumenta, rimanendo attorno al 90%, ma migliora la definizione dei segnali prodotti dalla spettrometria di massa (Ding et al., 2004; Li et al., 2006a, 2006b, 2007). L'utilizzo della MALDI TOF MS e dell'arricchimento del DNA embrio-fetale libero al momento rappresenta quindi la migliore strategia per distinguere il DNA embrio-fetale rispetto a quello materno. La spettrometria di massa risulta inoltre potenzialmente applicabile a molte altre aree che interessano il rilevamento del DNA embrio-fetale libero, come la sua quantificazione nel plasma materno che fino a ora si è basata sul rilevamento di sequenze specifiche del cromosoma Y, prevalentemente attraverso esperimenti di *real time PCR*.

Se da una parte numerosi sforzi sono stati realizzati per la messa a punto di sistemi sempre più sensibili per rilevare le più piccole differenze tra il DNA embrio-fetale e quello materno, al fine di consentire un utilizzo su larga scala del DNA embrio-fetale per la diagnosi prenatale non invasiva, dall'altra parte numerosi sforzi sono stati fatti per identificare un marcatore universale del DNA embrio-fetale, che permettesse di analizzare tutte le gravidanze e non solo quelle con un feto maschio. La maggior parte degli studi in questo

senso si sono concentrati sull'esistenza di differenze epigenetiche tra il DNA del feto e quello della madre, che ne rende possibile la discriminazione. Poiché uno dei fenomeni epigenetici meglio caratterizzato è la metilazione, i ricercatori hanno indagato proprio nelle differenze di metilazione tra il DNA embrio-fetale e il DNA materno (Chim et al., 2005; Chan et al., 2006). Dal momento che la placenta è candidata come la principale fonte di DNA embrio-fetale, in essa sono stati cercati *patterns* di metilazione diversi. Nel 2005 Chim e colleghi hanno dimostrato che il gene Maspina è ipometilato nelle cellule placentari e ipermetilato nelle cellule ematopoietiche materne (Chim et al., 2005). Ancora più recentemente è stato dimostrato che il promotore del gene RASSF1A è ipermetilato nella placenta e ipometilato nelle cellule ematopoietiche materne (Chan et al., 2006). Con l'avvio dello *Human Epigenome Project* il numero di marcatori epigenetici è destinato a crescere nei prossimi anni. È auspicabile che parallelamente vengano sviluppate nuove tecniche per l'identificazione dei marcatori epigenetici. Le tecnologie attualmente in uso, infatti, si basano su saggi di PCR che sono relativamente impegnativi da progettare ed allestire e richiedono molto tempo, frenando ancora una volta l'utilizzo *routinario* del DNA embrio-fetale libero nella diagnosi prenatale di malattie genetiche.

Numerosi studi suggeriscono che il DNA embrio-fetale libero possa essere usato come fattore predittivo di gravidanze a rischio. Un aumento della sua quantità nel plasma/siero materni è stato descritto in numerosi casi di gravidanze con complicazioni o con anomalie cromosomiche. La prima patologia ad essere associata ad un incremento della quantità del DNA embrio-fetale libero è stata la preeclampsia, per la quale è stato riportato un aumento di ben 5 volte rispetto alle gravidanze normali (Lo et al., 1999b). Questi risultati sono stati riprodotti da numerosi altri gruppi (Zhong et al., 2001, 2006; Swinkels et al., 2001; Leung et al., 2001; Lau et al., 2002; Sekizawa et al., 2003), che tra l'altro sono riusciti a dimostrare che l'incremento della concentrazione del DNA embrio-fetale libero

avviene prima che compaiano i segni della preeclampsia (Leung et al., 2001; Zhong et al., 2002; Levine et al., 2004). È stato inoltre dimostrato che la preeclampsia è accompagnata da un difetto nella *clearance* del DNA embrio-fetale dal plasma materno, in grado di spiegare almeno in parte l'aumento del DNA nella circolazione materna (Lau et al., 2002). È interessante notare che la preeclampsia è caratterizzata da anomalie a carico della placenta (Roberts et al., 2000; Roberts and Lain, 2002; Redman and Sargent, 2003) e siccome la placenta rappresenta la principale fonte di DNA embrio-fetale libero, numerosi gruppi hanno deciso di studiarne l'andamento quantitativo in altre patologie affini. In questo modo è stato trovato un aumento dei livelli di DNA embrio-fetale libero anche nei casi di placenta previa, placenta invasiva e placenta increta (Sekizawa et al., 2002; Jimbo et al., 2003).

Altri studi hanno evidenziato un aumento del DNA embrio-fetale libero nel plasma/siero materni in numerosi altri disturbi della gravidanza, come il parto prematuro (Leung et al., 1998; Farina et al., 2005), la morte intrauterina del feto (Zhong et al., 2006), l'emorragia fetomaterna (Lau et al., 2000; Samura et al., 2003), l'iperemesi (Sekizawa et al., 2001b; Sagito et al., 2003) e il polidramnio (Zhong et al., 2000b). Alla luce di questi studi risulta evidente che il DNA embrio-fetale libero nella circolazione materna rappresenta un utile marcatore per monitorare la gravidanza. Dal momento però che la sua concentrazione aumenta in un numeroso gruppo di patologie, esso non costituisce un marcatore specifico per una determinata patologia, e rimane un marcatore generico, che avverte di un rischio legato alla gravidanza, da indagare ulteriormente.

Deviazioni della concentrazione del DNA embrio-fetale libero rispetto alle gravidanze normali sono state riportate anche nel caso di gravidanze con feti affetti da aneuploidie cromosomiche. In realtà a causa del numero limitato di campioni esaminati, i dati sono piuttosto contrastanti. Infatti mentre vari gruppi hanno dimostrato un aumento del DNA embrio-fetale libero in presenza di trisomia 21 e 13, ma non

18 (Lo et al., 1999a; Zhong et al., 2000a, Lee et al., 2002; Farina et al., 2002, 2003; Wataganara et al., 2003), altri gruppi non hanno rilevato nessun aumento o comunque nessuna differenza nei livelli di DNA embrio-fetale libero (Ohashi et al., 2001; Hromadnikova et al., 2002; Gerovassili et al., 2007). Uno studio molto recente ha evidenziato che i valori del DNA embrio-fetale libero nel plasma/siero materni in caso di aneuploidie presentano un certo grado di sovrapposizione con i valori riportati per le gravidanze normali, spiegando come mai alcuni autori non siano stati in grado di rilevare un aumento della concentrazione del DNA embrio-fetale. Tale evidenza sottolinea la necessità di ulteriori studi per chiarire il possibile ruolo del DNA embrio-fetale libero come fattore prognostico per le aneuploidie cromosomiche (Bauer et al., 2006).

Gli studi condotti fino ad ora, sia per quanto riguarda le aneuploidie cromosomiche sia per quanto riguarda le complicazioni della gravidanza, si basano sulla quantificazione del DNA embrio-fetale libero attraverso il rilevamento di sequenze Y-specifiche, rendendo possibile l'indagine solamente nei feti maschi. L'uso di marcatori indipendenti dal sesso del feto e l'utilizzo di nuove tecnologie per il rilevamento del DNA embrio-fetale in futuro permetteranno di superare questo limite, rendendo possibile un utilizzo su larga scala del DNA embrio-fetale libero.

## 2. SCOPO

### *2.1 Scopo della tesi*

Lo scopo di tale studio consiste nella quantificazione tramite *real time* PCR del DNA embrio-fetale libero nel siero materno nel primo trimestre di gravidanza attraverso l'utilizzo di una nuova sonda multipla. Essendo in grado di amplificare anche piccole quantità di DNA, tale sonda risulta più adatta e sensibile per lo studio delle scarse quantità di DNA embrio-fetale libero che si ritrovano all'inizio della gravidanza. Il presente lavoro inoltre si prefigge di stabilire il momento della comparsa del DNA embrio-fetale nella circolazione materna, al fine di determinare la settimana di gestazione ottimale per eseguire il prelievo del sangue materno e per poter effettuare indagini genetiche, minimizzando il rischio di errori diagnostici.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Raccolta e preparazione dei campioni

Allo studio hanno partecipato 57 donne gravide comprese tra la quinta e la dodicesima settimana di gestazione. Ad ogni donna è stato richiesto di firmare il consenso informato.

Delle 57 pazienti 13 erano a rischio per un feto affetto da una malattia *X-linked*, le rimanenti 44 non avevano alcuna indicazione di rischio per malattie genetiche. Ad ogni donna è stato chiesto di ripetere il prelievo di sangue a distanza di due settimane. In questo modo è stato possibile raccogliere 3 prelievi per 15 donne, 2 prelievi per 20 donne e 1 prelievo per 22 donne. Per ogni paziente sono stati prelevati 9 ml di sangue periferico in provette sterili senza anticoagulante per la separazione del siero. I campioni di sangue sono stati processati subito dopo il prelievo: in particolare essi sono stati centrifugati a 3000 g per 30 minuti, e il siero ottenuto, aliquotato in tubi da 1,5 ml, è stato ulteriormente centrifugato a 3000 g per 10 minuti allo scopo di rimuovere eventuali residui cellulari. Il siero è stato aliquotato in nuovi tubi da 1,5 ml conservato a – 20 °C fino al momento dell'estrazione.

#### 3.2 Messa a punto dell'estrazione del DNA dal siero

L'estrazione del DNA è stata messa a punto utilizzando il siero di 10 donne volontarie non gravide.

Il siero di ogni campione è stato sottoposto ad estrazione con due diversi *kit*, al fine di valutare il più adatto: in particolare sono stati impiegati il *QIAamp DNA Blood Midi Kit* (Qiagen, Hilden, Germania) e l' *EXTRAgen kit* (Amplimedical, Torino, Italia).



Il DNA presente nel plasma/siero ammonta ad una quantità di circa 100 ng/ml (Pertl et al., 2001). Tenendo conto di un'efficienza d'estrazione inferiore al 100%, il DNA recuperabile non sarebbe visibile su gel di agarosio. Per stabilire il numero di genomi equivalenti estratti con i due diversi kit quindi è stata utilizzata l'amplificazione standardizzata di una sequenza di beta-actina tramite una PCR quantitativa assoluta in *real time*. La beta-actina è un gene localizzato sul cromosoma 7 e quindi rappresenta un indicatore della quantità di genomi equivalenti. La reazione comprendeva una scala di taratura a concentrazioni note di DNA (1000, 100, 10 e 1 genomi equivalenti/ml).

### 3.3 Estrazione del DNA da siero

Il DNA è stato estratto dal siero utilizzando l'*EXTRAgen Kit* (Amplimedical, Torino, Italia). Per ogni paziente sono state effettuate 5 estrazioni per un totale di 1,5 ml di siero estratti. In ogni tubo di estrazione il DNA è stato risospeso in 12 µl di acqua ultrapura e al termine dell'estrazione le 5 aliquote di DNA sono state unite in un unico tubo per un totale di 60 µl di DNA. Il DNA estratto è stato conservato a -20 °C fino al momento dell'allestimento della reazione di PCR quantitativa.

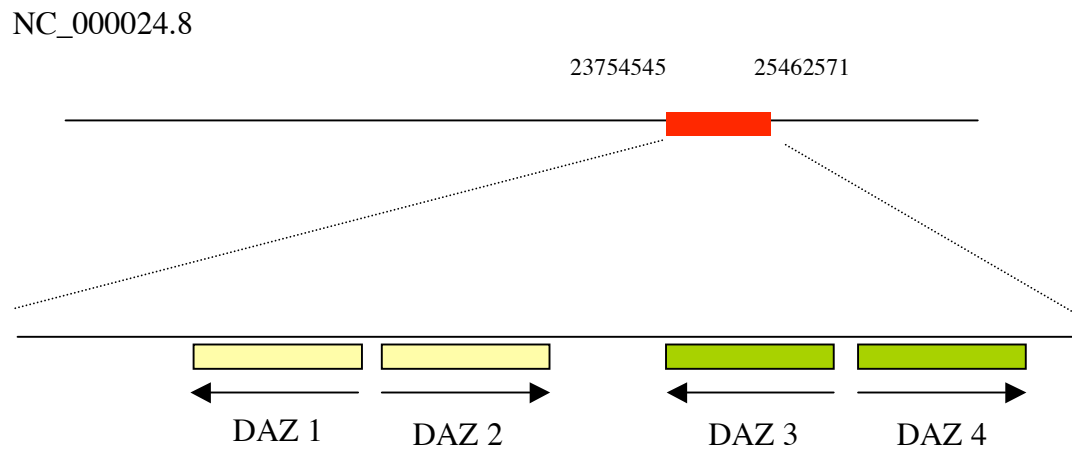
### 3.4 Progettazione della sonda

Per rilevare il DNA embrio-fetale è stato necessario amplificare sequenze che non fossero presenti nel genoma materno, come le sequenze Y-specifiche. La maggior parte dei lavori riportati in letteratura utilizza come gene bersaglio il gene SRY (OMIM: 480000) presente in singola copia sul cromosoma Y. Per il nostro studio invece abbiamo utilizzato come bersaglio la famiglia di geni DAZ (*Deleted*

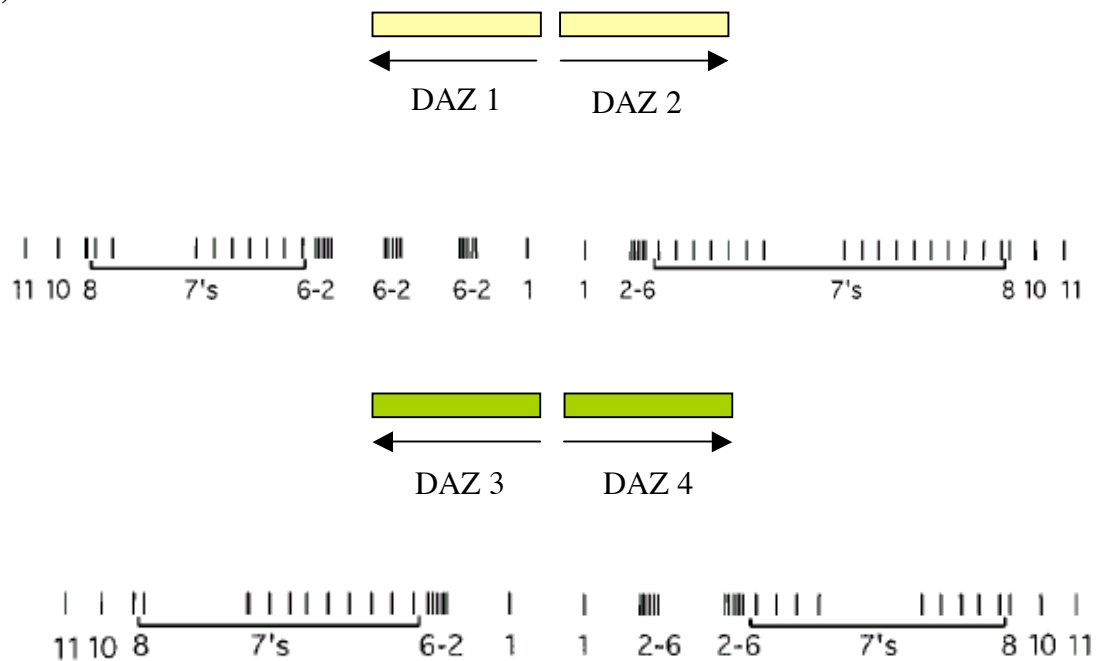
In *Azoospermia*) (OMIM: 400026, 400003), presenti in 4 copie (DAZ1, DAZ2, DAZ3, DAZ4) sul cromosoma Y. I geni DAZ sono localizzati sul braccio lungo del cromosoma Y nella regione AZFc (Azoospermia Factor Region c), sono candidati ad avere un ruolo nella spermatogenesi e vengono trascritti solamente nelle cellule germinali del testicolo dove codificano per una proteina di legame all'RNA (Reijo et al., 1995; Saxena et al., 1996; Menke et al., 1997). Si organizzano in due *clusters* ciascuno contenente una coppia di geni DAZ con opposto orientamento ( 3' ← 5':: 5' → 3'). In particolare DAZ1 forma un *cluster* con DAZ2 e DAZ3 forma il secondo *cluster* con DAZ4. Ognuno dei quattro geni è costituito da almeno 7 copie ripetute in *tandem* di una unità di 2.4Kb contenente un esone di 72 pb (esone 7) che codifica per un peptide di 24 aminoacidi. Ciascun gene inoltre contiene un numero variabile di una sequenza ripetuta di 10.8Kb, che include 5 esoni (esoni 2-6), codificanti per un dominio di legame all'RNA.(Saxena et al., 2000). Lo schema dei geni è riportato in figura 3.1.

Come gene di controllo abbiamo utilizzato il gene della beta-actina, localizzato sul cromosoma 7. L'amplificazione del gene di controllo è stata necessaria per verificare l'effettiva presenza del DNA nel siero, il successo dell'estrazione del DNA e per quantificare il DNA totale costituito dal DNA materno e dal DNA embrio-fetale.

A)



B)

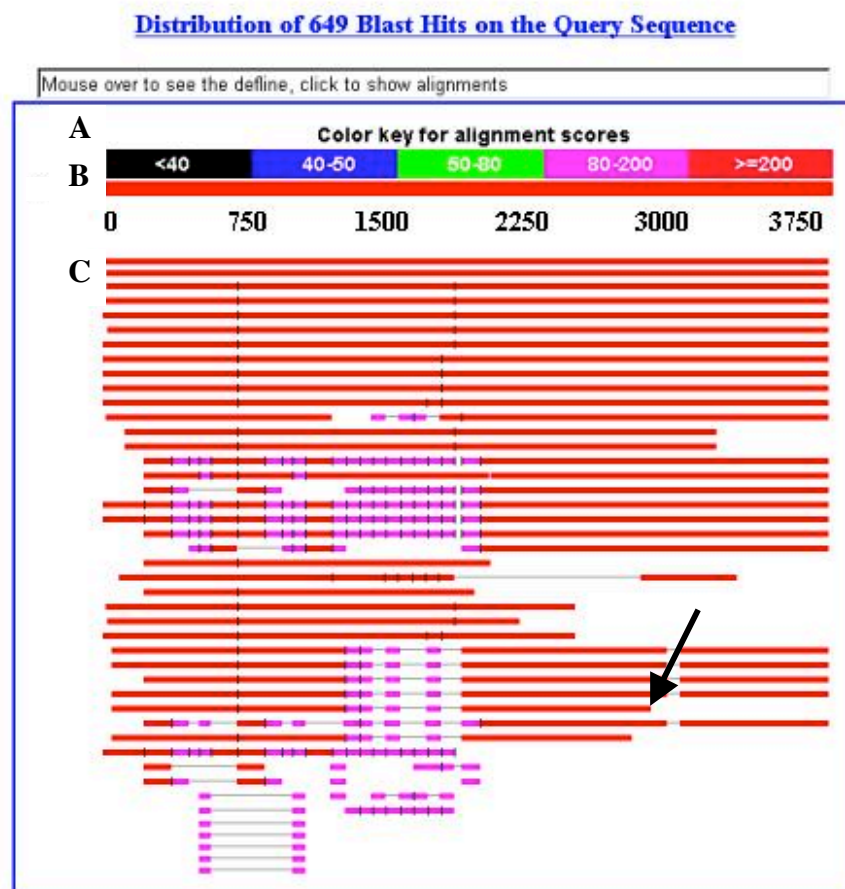


**Figura 3.1** Organizzazione e struttura dei geni DAZ1, DAZ2, DAZ3 e DAZ4. In A) è rappresentata la localizzazione dei geni nel contesto del contiguo (Accession Number NC\_000024.8). In B) è rappresentata la loro organizzazione in *clusters*, con le due coppie di geni DAZ disposti con opposto orientamento e le unità di 2,4 e 10,8 Kb ripetute.

### 3.5 Analisi del gene per la progettazione dei primers

Prima di progettare i *primers* per l'amplificazione del DNA embrio-fetale è stato necessario verificare l'unicità della sequenza dei geni DAZ nel genoma al fine di evitare la costruzione dei *primers* su sequenze di DNA che non fossero specifiche solo di questi geni. La progettazione dei *primers* su sequenze non appartenenti al cromosoma Y infatti avrebbe resa vana l'individuazione del DNA fetale maschile amplificando sequenze presenti nel genoma materno. A questo scopo è stato utilizzato un set di programmi per la ricerca dell'omologia tra sequenze, chiamato BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; Altschul et al., 1990; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

L'analisi con BLAST, come mostra la figura 3.2 conferma che i geni DAZ presentano omologia di sequenza con altri geni su autosomi. Queste zone sono state evitate durante la costruzione dei *primers*. In particolare i geni DAZ presentano una elevata omologia con il gene DAZL (*Deleted In Azoospermia Like*) sul cromosoma 3. Alcuni studi suggeriscono infatti che la famiglia di geni DAZ abbia avuto origine dalla trasposizione del gene DAZL dal cromosoma 3 sul cromosoma Y con successive amplificazioni e modificazioni durante l'evoluzione dei primati (Saxena et al., 2000).



**Figura 3.2** Schema del *pattern* di riconoscimento dei geni DAZ. In questo caso è stato preso in considerazione il gene DAZ1. Risultati simili si ottengono con gli altri geni DAZ. A) Il grafico mostra una scala di colori ai quali vengono attribuiti i diversi gradi di omologia. In B) è schematizzata la sequenza sottoposta all'analisi mentre in C) sono mostrate le sequenze depositate nelle banche dati che hanno un'omologia con DAZ1. Le prime rette rappresentano il riconoscimento della sequenza "con se stessa" depositata in banca dati con diversi *Accession Number* e con gli altri geni DAZ. La freccia indica l'omologia con il gene DAZL sul cromosoma 3

La figura 3.3 mostra i numeri d'accesso delle sequenze schematizzate in figura 3.2. Nelle prime posizioni sono riportate le diverse sequenze, depositate nelle banche dati, dei geni DAZ che mostrano tra di loro una elevatissima omologia, superiore al 99,9% (Saxena et al., 2000).

Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">NM_004081.4</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia 1 (DAZ1), mRNA	<a href="#">6940</a>	6940	99%	0.0	99%	<a href="#">UG</a> <a href="#">EG</a>
<a href="#">NM_001005375.1</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia 4 (DAZ4), transcript variant 1,	<a href="#">6909</a>	6909	99%	0.0	99%	<a href="#">UG</a> <a href="#">EG</a>
<a href="#">NM_020363.2</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia 2 (DAZ2), transcript variant 1,	<a href="#">4527</a>	1.245e+04	99%	0.0	100%	<a href="#">UG</a> <a href="#">EG</a>
<a href="#">NM_001005785.1</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia 2 (DAZ2), transcript variant 2,	<a href="#">4499</a>	1.151e+04	99%	0.0	100%	<a href="#">UG</a> <a href="#">EG</a>
<a href="#">AF414184.1</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia 2 (DAZ2) mRNA, complete cds	<a href="#">4499</a>	1.151e+04	99%	0.0	100%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">NM_020364.2</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia 3 (DAZ3), mRNA	<a href="#">4423</a>	9209	99%	0.0	100%	<a href="#">UG</a> <a href="#">EG</a>
<a href="#">BC036648.1</a>	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4829066, containing frame-shift	<a href="#">4416</a>	1.327e+04	99%	0.0	99%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">NM_020420.2</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia 4 (DAZ4), transcript variant 2,	<a href="#">4285</a>	8812	99%	0.0	100%	<a href="#">UG</a> <a href="#">EG</a>
<a href="#">BC047480.1</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia 4, mRNA (cDNA clone	<a href="#">4285</a>	8812	99%	0.0	100%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">BC047617.1</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia 4, mRNA (cDNA clone	<a href="#">4279</a>	8803	99%	0.0	100%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">NM_001005786.1</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia 2 (DAZ2), transcript variant 3,	<a href="#">4276</a>	8581	99%	0.0	100%	<a href="#">UG</a> <a href="#">EG</a>
<a href="#">AL833003.1</a>	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp666C074 (from clone	<a href="#">3461</a>	4005	59%	0.0	100%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">BC113006.1</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia 2, mRNA (cDNA clone	<a href="#">3417</a>	1.021e+04	81%	0.0	100%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">BC113005.1</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia 3, mRNA (cDNA clone	<a href="#">3341</a>	7955	81%	0.0	100%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">U66077.1</a>	Human DAZ mRNA, 3'UTR	<a href="#">3304</a>	3304	48%	0.0	97%	<a href="#">UG</a> <a href="#">EG</a>
<a href="#">AC006338.6</a>	Homo sapiens BAC clone RP11-539D10 from Y, complete sequence	<a href="#">3280</a>	1.461e+04	94%	0.0	100%	
<a href="#">AC010088.4</a>	Homo sapiens BAC clone RP11-289L7 from Y, complete sequence	<a href="#">3280</a>	3470	50%	0.0	100%	
<a href="#">AC006983.4</a>	Homo sapiens BAC clone RP11-70G12 from Y, complete sequence	<a href="#">3280</a>	8470	66%	0.0	100%	
<a href="#">AC010089.4</a>	Homo sapiens BAC clone RP11-290O3 from Y, complete sequence	<a href="#">3280</a>	1.157e+04	99%	0.0	100%	
<a href="#">AF164343.1</a>	Homo sapiens chromosome Y BAC clone 148I14 from Deleted in	<a href="#">3280</a>	1.304e+04	99%	0.0	100%	
<a href="#">AC000021.1</a>	Origins of the DAZ gene cluster on the human Y chromosome: an	<a href="#">3280</a>	8920	94%	0.0	100%	
<a href="#">AC000022.1</a>	Genomic sequence from Human Y, complete sequence	<a href="#">3280</a>	3470	50%	0.0	100%	
<a href="#">AF271088.1</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia (DAZ) mRNA, partial cds	<a href="#">2953</a>	3870	47%	0.0	100%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">BC114927.1</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia 1, mRNA (cDNA clone	<a href="#">2342</a>	7217	59%	0.0	100%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">AF248483.1</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia 4 (DAZ4) mRNA, partial cds	<a href="#">2305</a>	3215	45%	0.0	99%	<a href="#">UG</a> <a href="#">EG</a>
<a href="#">AF248482.1</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia 4 (DAZ4) mRNA, partial cds	<a href="#">2191</a>	2191	30%	0.0	100%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">AF248480.1</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia 2 (DAZ2) mRNA, complete cds	<a href="#">2176</a>	1.010e+04	64%	0.0	100%	<a href="#">UG</a> <a href="#">EG</a>
<a href="#">AF248481.1</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia 3 (DAZ3) mRNA, complete cds	<a href="#">2063</a>	6696	56%	0.0	100%	<a href="#">UG</a> <a href="#">EG</a>
<a href="#">U21663.1</a>	Homo sapiens DAZ protein (DAZ) mRNA, complete cds	<a href="#">1929</a>	6234	64%	0.0	100%	<a href="#">UG</a> <a href="#">EG</a>
<a href="#">AF271087.1</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia (DAZ) precursor RNA, partial	<a href="#">1797</a>	3882	47%	0.0	100%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">U66726.2</a>	Homo sapiens germline specific RNA binding protein (DAZL1) mRNA,	<a href="#">1365</a>	4224	88%	0.0	92%	<a href="#">UG</a> <a href="#">EG</a>
<a href="#">NM_001351.2</a>	Homo sapiens deleted in azoospermia-like (DAZL), mRNA	<a href="#">1360</a>	4219	88%	0.0	92%	<a href="#">UG</a> <a href="#">EG</a>
<a href="#">BX648638.1</a>	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686B1039 (from clone	<a href="#">1345</a>	4043	84%	0.0	92%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">U66078.1</a>	Human DAZLA mRNA, complete cds	<a href="#">1338</a>	4174	88%	0.0	92%	<a href="#">UG</a> <a href="#">EG</a>

**Figura 3.3** Elenco dei numeri d'accesso delle sequenze schematizzate in figura 3.2. La freccia indica il gene DAZL.

### 3.6 Rilevamento di sequenze Y specifiche mediante PCR quantitativa

Il DNA embrio-fetale libero presente nel siero materno è stato rilevato e quantificato tramite la tecnica della *real time* PCR. Con questa tecnica si visualizzano i prodotti di amplificazione a mano a mano che sono sintetizzati, e ciò è reso possibile grazie all'utilizzo di *primers*, sonde o ampliconi marcati con molecole fluorescenti.

Esistono fondamentalmente cinque chimiche con cui può essere utilizzata la *real time*:

1. fluorofori che legano il DNA,
2. sonde adiacenti lineari,
3. sonde TaqMan,
4. sonde con *hairpin*,
5. ampliconi auto fluorescenti,

che a loro volta comprendono metodiche sequenza-specifiche e metodiche sequenza-non specifiche.

I metodi di rilevamento sequenza non specifica si basano sull'utilizzo di molecole fluorescenti che legano il DNA. Le prime e più semplici applicazioni della real time si basano su queste chimiche, dove vengono utilizzate molecole che s'intercalano nel DNA a doppio filamento, come il bromuro di etidio, YO-PRO-1 e SYBR *green* 1, ed emettono fluorescenza se eccitate con un'opportuna lunghezza d'onda. Queste metodiche non richiedono la sintesi di una sonda specifica, sono meno costose e si applicano ad ogni tipo di sequenza. Le molecole intercalanti però possono legare dimeri di *primers* o prodotti di amplificazione aspecifici, complicando in questo modo l'interpretazione dei risultati.

I metodi di rilevamento sequenza specifica si basano sull'utilizzo di sonde fluorogeniche, progettate in modo da ibridizzare all'interno di una sequenza *target*, e comprendono le altre quattro chimiche. Nella metodica basata sull'utilizzo di sonde adiacenti lineari vengono utilizzate due sonde, la prima marcata al 3' con un fluoroforo emettitore (*reporter*), la seconda marcata al 5' con un fluoroforo accettore (*quencher*). In assenza di amplificazione il fluoroforo *reporter* emette fluorescenza. Quando si forma l'amplicone le sonde si legano alla sequenza amplificata: la fluorescenza emessa dal *reporter* viene assorbita dal *quencher* e il sistema rileva un diminuzione della fluorescenza.

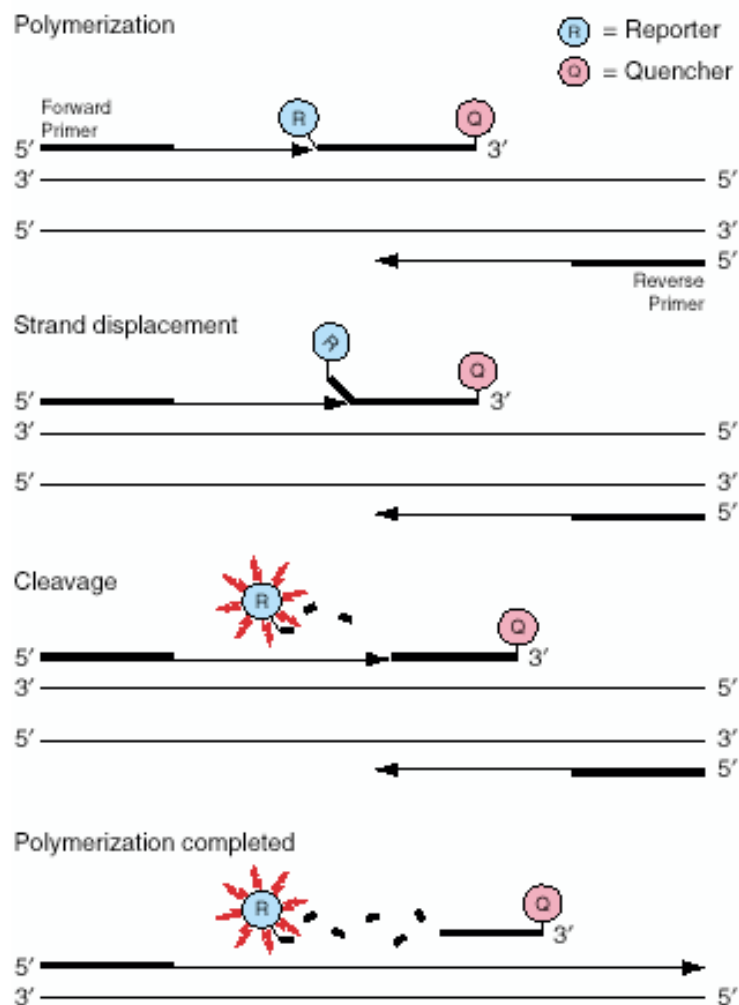
Le sonde *hairpin* sono costituite da una sequenza in parte complementare, per cui la sonda si ripiega su se stessa formando un *hairpin*. All'estremità della sonda sono legati il *reporter* e il *quencher*: nella configurazione a *hairpin* queste due molecole si ritrovano molto

vicine, la fluorescenza emessa dal *reporter* viene perciò assorbita dal *quencher*. Quando si forma il prodotto di amplificazione, la sonda si lega all'amplicone perdendo la sua struttura secondaria a *hairpin*: il *reporter* si allontana dal *quencher* ed è libero di emettere fluorescenza, che viene rilevata dalla macchina.

Gli ampliconi autofluorescenti agiscono in maniera simile alle sonde *hairpin*, ma in questo caso i fluorofori vengono incorporati in maniera irreversibile al prodotto di PCR. Ciò è possibile perché la sonda all'estremità 3' ha legato il *primer* specifico di amplificazione.

In questo studio è stata utilizzata una sonda TaqMan. Tali sonde permettono di monitorare la reazione di amplificazione grazie all'attività 5' esonucleasica della Taq polimerasi sul DNA bersaglio. Questo tipo di sonde sono marcate con due fluorofori (un *reporter* e un *quencher*), e sono progettate in modo da ibridizzarsi in una sequenza interna ai *primers* di amplificazione. Generalmente sono lunghe 20-30 basi e non possono essere estese poiché presentano l'estremità 3' fosforilata. Quando la sonda è intatta la fluorescenza emessa dal primo fluoroforo viene assorbita dalla seconda molecola dando luogo al fenomeno del "*fluorescent energy transfer*". Durante la fase di estensione della reazione di PCR la sonda viene tagliata dalla Taq solo quando essa è ibridizzata al *target*: il taglio determina il distacco del fluoroforo *reporter* la cui fluorescenza non viene più assorbita dal *quencher*, come è mostrato in figura 3.4.





**Figura 3.4** Quando la sonda è integra la fluorescenza è assorbita dal *quencher* (rappresentato in rosa); il taglio della sonda distacca il *reporter* (in azzurro) consentendo l'emissione di fluorescenza.

Questa sequenza di eventi avviene in ciascun ciclo di PCR senza interferire con la reazione enzimatica e con l'accumulo del prodotto di PCR. Poiché l'attività esonucleasica della Taq polimerasi agisce solo se la sonda fluorogena è legata alla sequenza bersaglio e l'enzima non può idrolizzare la sonda se questa si trova libera in soluzione,

l'aumento della fluorescenza è proporzionale alla quantità del prodotto di PCR specifico. Durante la reazione i campioni vengono eccitati tramite un *laser* o una lampada e la fluorescenza emessa viene rilevata da uno spettrofotometro a fluorescenza, che consente l'analisi simultanea di 96 campioni per ogni reazione di PCR.

Per normalizzare le fluttuazioni di fluorescenza non correlate alla reazione di amplificazione, viene utilizzato un fluoroforo di riferimento interno (6-carbossi-N, N, N', N'-tetrametilrodamina, ROX), detto anche “passivo”, presente nel *buffer* di reazione. Il *software* calcola, tramite un apposito algoritmo, un valore denominato Rn (o RQ) usando la seguente equazione:

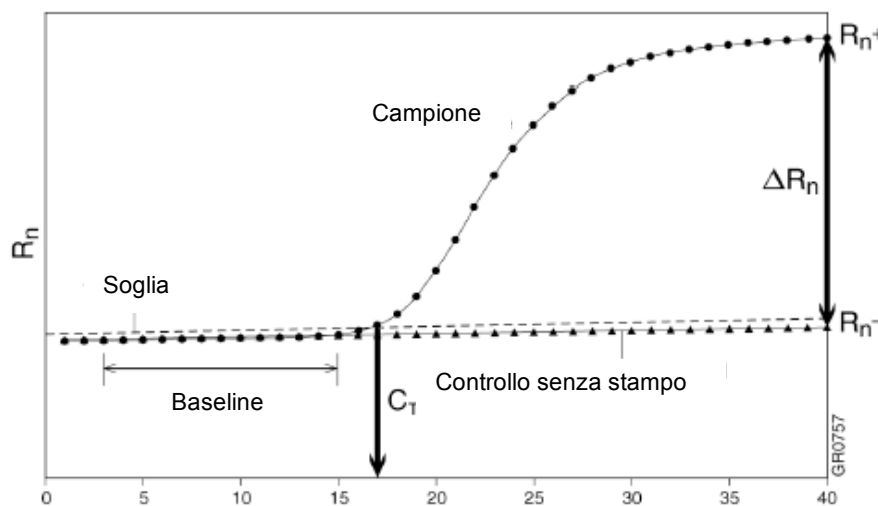
$$\text{deltaRn} = (\text{Rn}+) - (\text{Rn} - )$$

$$\text{dove } \text{Rn}+ = \frac{\text{intensità di emissione del } \textit{reporter}}{\text{intensità di emissione del ROX}}$$

$$\text{e } \text{Rn} - = \frac{\text{intensità di emissione del } \textit{reporter} \text{ (in assenza di stampo)}}{\text{intensità di emissione del ROX (in assenza di stampo)}}$$

I valori di deltaRn riflettono la quantità di sonda fluorescente degradata e aumentano in maniera esponenziale durante la reazione. La fluorescenza viene rivelata ad ogni ciclo e i dati vengono registrati su un diagramma di amplificazione dove sull'asse delle ordinate vengono riportati i valori di deltaRn e sull'asse delle ascisse il tempo rappresentato dal numero di cicli. Durante i primi cicli di amplificazione i valori di deltaRn rimangono pressoché costanti (*base-line*). Il diagramma di amplificazione viene esaminato nella fase logaritmica corrispondente all' aumento esponenziale di concentrazione del prodotto, un esempio di diagramma è rappresentato in figura 3.5. L'analisi è eseguita attribuendo arbitrariamente un valore soglia in funzione della variabilità della *base-line*. L'algoritmo determina, cioè, una soglia che viene calcolata

sommando il valore del segnale medio della *baseline* nei primi 15 cicli più 10 deviazioni standard. Il numero del ciclo durante il quale la fluorescenza di ciascun campione raggiunge questa soglia è detto  $C_t$ , la fase di amplificazione esponenziale inizia dal ciclo corrispondente al  $C_t$ . Il  $C_t$  è inversamente proporzionale al numero di copie di sequenze *target* presenti all'inizio della reazione; il diagramma di amplificazione viene spostato a destra se la quantità di *target* iniziale diminuisce: ciò accade perché sono necessari più cicli di amplificazione per degradare una quantità sufficiente di sonda e quindi per produrre una sufficiente quantità di fluorescenza da raggiungere la soglia (Heid et al., 1996).



**Figura 3.5** Diagramma di amplificazione, vengono mostrati la soglia, il  $C_t$ , il  $\Delta R_n$ .

Il  $C_t$  viene utilizzato per quantificare il DNA iniziale presente in ciascun campione basandosi su una curva standard generata con una quantità esatta di DNA o RNA che viene amplificata nella stessa reazione di PCR. Per la curva di normalizzazione viene amplificato un gene di controllo che è presente in una quantità relativamente costante in tutti i campioni. Esempi di geni di controllo sono: beta-actina,

Rnasi P, Htert.

Rispetto a una PCR quantitativa classica nella *real time* PCR quindi non è necessario progettare dei controlli interni o esterni, ma è sufficiente costruire la curva di normalizzazione. Generalmente si usano anche 3 controlli senza stampo per stabilire l'intensità di emissione del *reporter* legato al *quencher* nella sonda integra.

La maggior parte delle reazioni di PCR raggiungono una fase di *plateau* di emissione di fluorescenza del fluoroforo. Nella preparazione della sonda i fluorofori più utilizzati sono:

*Reporter*: può essere la 6-carbossifluorisceina (FAM), il tetracloro-6-carbossifluorisceina (TET) o esacloro-6-carbossifluorisceina (HEX) : esso si lega covalentemente all'estremità 5' della sonda. Alcune caratteristiche dei fluorofori più utilizzati sono rappresentate in tabella 3.1.

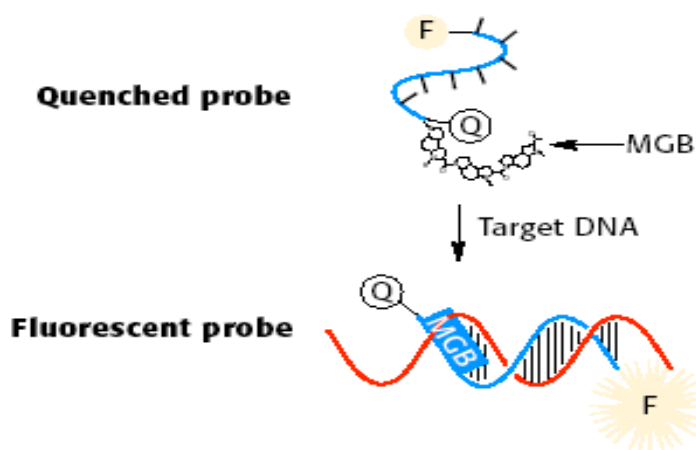
*Quencher*: è generalmente la 6-carbossitetrametilrodamina (TAMRA): esso si lega 2 o più basi downstream rispetto al *reporter*, oppure può essere una molecola non fluorescente.

Chromophore	Extinction Coefficient	Number	Extinction Coefficient Contribution
A	15,200	1	15,200
C	7050	6	42,300
G	12,010	5	60,050
T	8400	6	50,400
FAM	20,958	1	20,958
TAMRA	31,980	1	31,980
TET	16,255	0	—
VIC	30,100	—	—
Total	—	—	220,888

$$\begin{aligned}
 \text{Absorbance (260 nm)} &= \text{sum of extinction coefficient contributions} \times \text{cuvette pathlength} \times \text{oligonucleotide concentration}/100 \\
 0.13 &= 220,888 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 0.3 \text{ cm} \times C/100 \\
 C &= 196 \mu\text{M}
 \end{aligned}$$

**Tabella 3.1** Sono elencati i diversi fluorofori utilizzati in *real time* PCR, con alcune caratteristiche tra cui il coefficiente di estinzione.

Per rilevare il DNA embrio-fetale è stata utilizzata una sonda *Minor Groove Binding* (MGB), che non contiene il fluoroforo TAMRA, ma adiacente al FAM contiene una molecola che funge da *quencher* senza emettere fluorescenza, come mostrato in figura 3.6. Tale molecola è legata covalentemente alla sonda grazie alla presenza di un apposito “*linker*” che lega il solco minore del DNA. Utilizzando questo tipo di sonda si evita il segnale di fluorescenza emessa dal TAMRA che rappresenta un rumore di fondo. Inoltre le sonde MGB formano dei *duplex* molto stabili con DNA *target* a singolo filamento, permettendo l’utilizzo di sonde più corte (13-15 bp) e permettendo di lavorare a temperature più elevate aumentando la specificità della reazione (Kutyavin et al., 2000). La possibilità di utilizzare sonde più corte rispetto a quelle comunemente utilizzate acquista particolare rilievo per le nostre reazioni di amplificazione in cui il DNA bersaglio è altamente frammentato, essendo stato dimostrato che il circa il 70% DNA embrio-fetale libero ha dimensioni inferiori a 300 pb (Chan et al., 2004; Li et al., 2004)



**Figura 3.6** Sonda MGB. F = *reporter* fluorescente Q = *quencher*

Per ottenere una quantificazione del DNA specifica e sensibile, i *primers* e le sonde sono stati progettati accuratamente per evitare

problemi quali il taglio inefficace della sonda o appaiamenti aspecifici, come nel caso di sonde che legano sequenze ripetute nel genoma.

Per progettare i *primers* e le sonde abbiamo utilizzato uno specifico *software*: “*Primer Express*”. Tale programma fornisce una serie di *primers* e sonde opportune per la sequenza desiderata. I *primers* che il programma elabora devono rispettare una serie di linee guida:

- avere una  $T_m$  compresa tra 58°C e 60°C,
- non contenere più di due G/C nelle ultime 5 basi,
- l'ultimo nucleotide del *forward* non deve essere una G,
- se si usa la sonda complementare, il nucleotide del *primer reverse* più vicino al 5' della sonda non deve essere una G,
- non devono essere presenti file di più di 3 G consecutive,
- amplificare una sequenza lunga 50-150 basi.

La sonda viene progettata sulla base di alcune regole in modo da:

- contenere una quantità di G + C pari al 40%-60%,
- evitare la presenza di *hairpin* e di regioni interne complementari,
- evitare estese regioni complementari ai *primers* e ripetizioni dello stesso nucleotide,
- avere una temperatura di *melting* di almeno 5° C superiore della  $T_m$  dei *primers*, in genere compresa tra 68° e 70°C (questo perché durante la fase di estensione a 72°C i *primers* vengono estesi per cui la loro  $T_m$  aumenta, mentre la sonda non può essere estesa a causa della presenza del fosfato alla sua estremità 3' perciò la sua  $T_m$  non aumenta: la sonda potrebbe quindi staccarsi dal DNA se la temperatura di estensione superasse la sua  $T_m$ .),
- avere un nucleotide diverso dalla G in posizione 5'.

Qui di seguito sono riportate le sequenze dei *primers* e della sonda progettati con *Primer Express*:

**Primer forward:** 5'-GCAACCTTTCTTTTCAGCCATT-3'

**Sonda:** FAM-5'-CTGCTTATCCAAGATC-3'

**Primer reverse:** 5'-TGATATCCAGCAGTGACCTGAAAT-3'

In figura 3.7 è riportato l'elenco dei 5 prodotti di amplificazione che si ottengono utilizzando i *primers* con le rispettive posizioni sul cromosoma Y.

UCSC In-Silico PCR	
<a href="#">chrY:25415184+25415250</a> 67bp	GCAACCTTTCTTTTCAGCCATTtcctgcttatccaagatcaccATTTCAGGTCAGTCTGGATA TCA
<a href="#">chrY:23806663+23806729</a> 67bp	GCAACCTTTCTTTTCAGCCATTtcctgcttatccaagatcaccATTTCAGGTCAGTCTGGATA TCA
<a href="#">chrY:23789950+23790016</a> 67bp	GCAACCTTTCTTTTCAGCCATTtcctgcttatccaagatcaccATTTCAGGTCAGTCTGGATA TCA
<a href="#">chrY:25353980-25354046</a> 67bp	GCAACCTTTCTTTTCAGCCATTtcctgcttatccaagatcaccATTTCAGGTCAGTCTGGATA TCA
<a href="#">chrY:23717906-23717972</a> 67bp	GCAACCTTTCTTTTCAGCCATTtcctgcttatccaagatcaccATTTCAGGTCAGTCTGGATA TCA

**Figura 3.7** Elenco dei 5 prodotti di amplificazione (2 in DAZ2, 1 in DAZ4, 1 in DAZ1 e 1 in DAZ3) che si ottengono utilizzando la sonda e i *primers* progettati usando il *software Primer Express*.

Per verificare la stabilità e la specificità dell'appaiamento dei *primers* e della sonda è stato utilizzato il programma "*Amplify*". Questo programma fornisce informazioni circa il legame dei *primers* alla sequenza, indica le  $T_m$  dei *primers* ed eventuali legami aspecifici in altre zone della sequenza in esame. Queste informazioni, esclusa la  $T_m$ , non vengono fornite dal *software "Primer Express"*.

Come gene di controllo è stato scelto il gene della beta-actina. I

*primers* e la sonda specifici per questo gene sono standardizzati e vengono forniti con il *kit TaqMan Core Reagents Kit* (Applied Biosystem, Foster City, CA,USA). Le loro sequenze sono riportate qui sotto:

***Primer forward:*** 5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'

**Sonda:**

**FAM-5'-ATGCCCTCCCCCATGCCATCCTGCGT-3'**

***Primer reverse:*** 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'

Le reazioni di PCR quantitativa sono state messe a punto utilizzando DNA genomico maschile. In particolare per determinare le concentrazioni ottimali dei *primers* sono state allestite reazioni di amplificazione in triplicato utilizzando come stampo soluzioni diluite di DNA contenenti 100, 10, 1 copia di genoma maschile a diverse concentrazioni di *primers*:

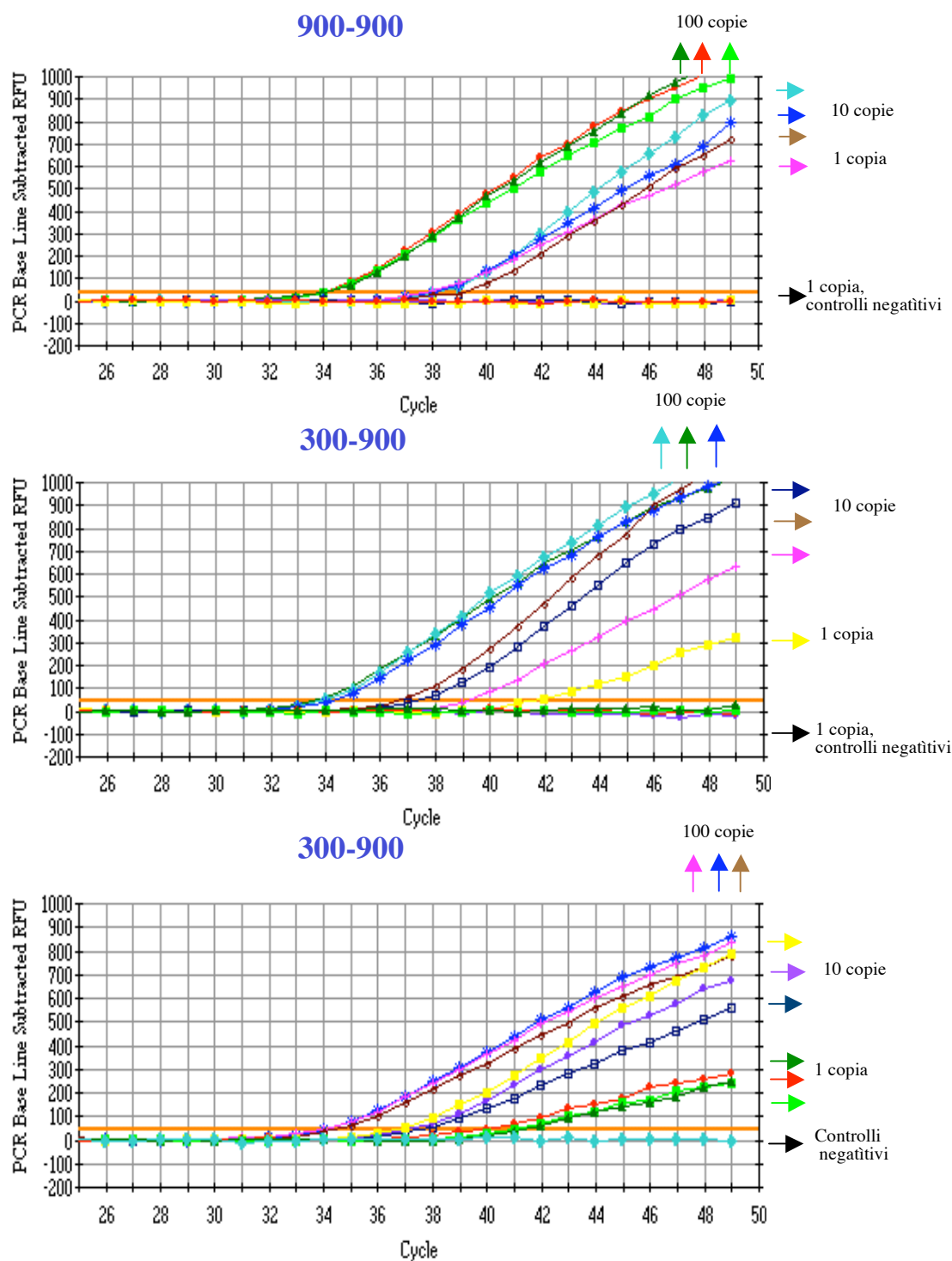
*forward* 900nM *reverse* 900nM

*forward* 900nM *reverse* 300nM

*forward* 300nM *reverse* 900nM.

La concentrazione ottimale è risultata la terza (300-900 nM). Con questa concentrazione, infatti, in ciascuna delle tre repliche è stato possibile amplificare una copia di genoma. Alle altre concentrazioni non in tutte le repliche si è ottenuta l'amplificazione di una copia (figura 3.8).





**Figura 3.8** La figura riporta i grafici ottenuti dall'amplificazione di soluzioni di DNA con diverse concentrazioni di *primers*. A) Sono state utilizzate concentrazioni pari a 900nm *forward* e 900nM *reverse*; in B) 300nm *forward* e 900nM *reverse*; in C) 300nm *forward* e 900nM *reverse*. Come si vede le concentrazioni ottimali sono 300-900, con queste infatti si ottiene l'amplificazione in tutte le 3 repliche.

### 3.7 *Analisi di delezione del gene DAZ*

Per escludere la presenza di delezioni frequenti a carico dei geni DAZ nei maschi fertili, con conseguente errore di diagnosi del sesso fetale, 100 individui fertili sono stati analizzati per la presenza dei geni DAZ. La fertilità dei campioni è stata stabilita sulla base dei figli che tali individui hanno avuto. Ogni campione è stato analizzato amplificando due diverse diluizioni di DNA stampo, a 10 copie e a 1 copia. Per ognuno dei 100 individui è stato ottenuto il consenso informato.

### 3.8 *Verifica della sensibilità di reazione*

Per verificare la sensibilità della reazione di *real time* PCR sono state amplificate soluzioni di DNA maschile contenenti 1000, 100, 10, 1 e 0,1 copie diluite in 10000 copie di DNA femminile. La curva standard di diluizione è stata preparata da DNA maschile a concentrazione nota. Per la determinazione del numero di copie è stato utilizzato un fattore di conversione di 6,6 pg per cellula: una copia di DNA (o genoma equivalente) corrisponde, infatti, a 6,6 pg di DNA. Sono state preparate soluzioni contenenti le seguenti concentrazioni di DNA: 1ng/μl, 0.1ng/μl, 0.01ng/μl, 0.001ng/μl, 0.0001ng/μl. Da ogni soluzione sono stati prelevati 6,6 μl per ottenere il numero di copie desiderato. Le diverse diluizioni di DNA sono state fatte a partire da DNA maschile a concentrazione nota (10 ng/μl) fornito col *kit* TaqMan PCR Core Reagents Kit ( Applied Biosystem).

### 3.9 *Verifica della specificità di reazione*

Per valutare la specificità delle reazione, è stata valutata la specificità dei *primers* e della sonda progettati, ovvero la loro

capacità di rilevare il DNA maschile ma non quello femminile. A questo scopo sono state allestite reazioni di amplificazione utilizzando sia DNA maschile, sia DNA femminile.

### 3.10 Allestimento della reazione di amplificazione

Per ridurre i problemi di inquinamento dovuti a eventuali amplificati rimasti dalle reazioni precedenti, nella reazione è stato utilizzato l'enzima uracile N-glicosilasi (UNG) che degrada gli acidi nucleici contenenti uracile e successivamente viene inattivato, non agendo sugli amplificati nascenti. Per DAZ e per la beta-actina sono state allestite due reazioni indipendenti, ciascuna in un volume finale di 25 µl contenenti: 1X *buffer*, 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dei nucleotidi trifosfato A, G, C, 400 µM del nucleotide trifosfato U, 0,125 unità di AmpliTaq Gold e 0.25 unità di UNG. Per la sonda DAZ sono stati usati 900 nM di *primer reverse*, 300 nM di *primer forward*, 250 nM di sonda marcata al 5' con 6-carossifluorisceina (6-FAM) e 10 µl di DNA stampo. Per la beta-actina sono stati utilizzati 6,6 µl di DNA stampo, 300 nM di ciascun *primer* e 200 nM di sonda, come indicato dal protocollo del TaqMan *PCR Core Reagents Kit* (Applied Biosystem). Il ciclo termico utilizzato è il seguente: 2' a 50°C per consentire l'attivazione dell'enzima uracile N-glicosilasi, 10' 95°C per la denaturazione iniziale e l'inattivazione dell'UNG; 50 cicli di 15" a 95°C per la denaturazione e 40" a 65°C per lo *step* di *annealing* e la fase di allungamento.

### 3.11 Curva di diluizione

Per quantificare il DNA embrio-fetale e il DNA totale circolanti nei campioni di siero, sono state utilizzate due curve standard di diluizione per DAZ e per la beta-actina preparate a partire da DNA

maschile a concentrazione nota (10 ng/μl), fornito col kit TaqMan *PCR Core Reagents Kit* (Applied Biosystem). In particolare sono state utilizzate le seguenti curve di calibrazione: 100, 10, 1 e 0.1 copie di DNA maschile per DAZ e 1000, 100, 10 e 1 copie di DNA maschile per la beta-actina. Per la determinazione del numero di copie è stato utilizzato il fattore di conversione di 6,6 pg per cellula. Sono state preparate soluzioni contenenti le seguenti concentrazioni di DNA: 1ng/μl, 0.1ng/μl, 0.01ng/μl, 0.001ng/μl, 0.0001ng/μl. Da ogni soluzione sono stati prelevati 6,6 μl per ottenere il numero di copie desiderato. Ogni punto delle scale di diluizione è stato ripetuto in triplicato in ogni reazione.

### *3.12 Analisi della casistica di 57 donne gravide*

Ogni campione è stato analizzato in triplicato e in ogni esperimento sono sempre stati amplificati in triplicato anche la curva di calibrazione per DAZ (100, 10, 1 e 0,1 copie) e per la beta-actina (1000, 100, 10 e 1 copia) e il DNA di un controllo negativo, ovvero il DNA estratto dal siero di una donna non gravida, al fine rilevare eventuali fenomeni di inquinamento durante l'estrazione del DNA. Almeno tre bianchi invece sono stati inclusi in ciascun esperimento sia per DAZ che per la beta-actina, per rilevare eventuali eventi di contaminazione durante l'allestimento della reazione.

Il sesso del feto determinato attraverso la *real time* PCR è sempre stato verificato attraverso cariotipo o analisi ultrasonografica.

### *3.13 Analisi statistica*

Per avere una stima del limite di rilevazione (LoD, *Limit of Detection*) del *test* è stata applicata l'analisi di regressione *probit* (SPSS 12 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), attribuendo

ai vari punti della scala di calibrazione di DAZ (100, 10, 1 e 0,1 copie per pozzetto) il significato di controllo positivo e il numero di copie di DAZ per pozzetto amplificate nei controlli negativi e nelle gravidanze con feti femmine, il significato di controlli negativi. Il numero di copie/PCR in corrispondenza o al di sopra del quale si raggiunge la probabilità del 95% di avere un feto maschio è stato indicato come 95% LoD.

La correlazione tra la variazione della concentrazione del DNA durante le varie settimane di gravidanza e il progredire della gravidanza stessa è stata calcolata attraverso l'analisi di regressione lineare di Pearson, settando il *P value* come  $< 0.05$ .

Per calcolare la quantità di DNA embrio-fetale per ogni millilitro è stata usata la seguente formula:

$$c = \frac{C_p}{10} \times 12 \times 100 \times 300$$

dove *c* è la quantità di genomi equivalenti da calcolare, *C<sub>p</sub>* è la quantità di genomi equivalenti di DAZ per PCR per campione, 10 sono i µl di DNA stampo usati nella reazione di PCR, 12 è il volume di H<sub>2</sub>O in cui è stato risospeso il DNA al termine dell'estrazione, per ogni tubo di estrazione, 300 sono i µl di siero usati per ogni tubo di estrazione e 1000 sono i µl per i quali calcolare il numero di genomi equivalenti.

### 3.14 Misure di anticontaminazione

A causa dell'alta sensibilità della *real time* PCR alcune misure di anticontaminazione si sono rese necessarie per evitare problemi dovuti ad inquinamenti da ampliconi. Le estrazioni di DNA e l'allestimento delle reazioni di amplificazione sono avvenute in

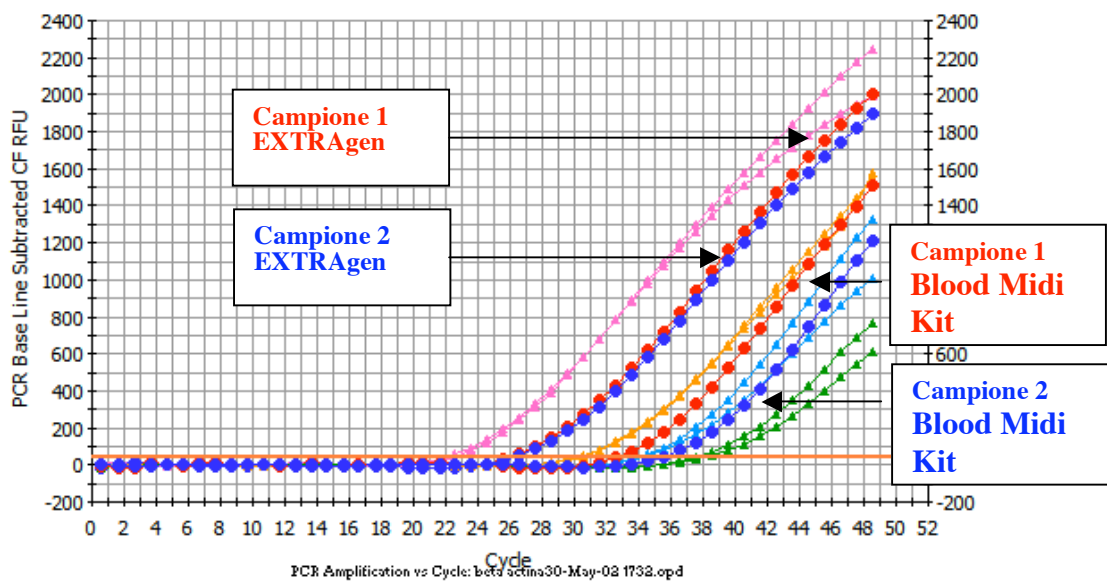
luoghi fisicamente separati fra di loro. Sono stati utilizzati cuffie, guanti, mascherine e camici di laboratorio a perdere per i diversi *steps*. Nell'allestimento delle reazioni di amplificazione sono stati utilizzati puntali con filtro, per eliminare il rischio di “*carryovers*”, e gli strumenti utilizzati sono stati esposti agli U.V. dopo ogni reazione.

## 4. RISULTATI

### *4.1 Messa a punto dell'estrazione del DNA dal siero*

L'estrazione del DNA totale libero è stata messa a punto utilizzando il siero di 10 donne volontarie non gravide. A questo scopo sono stati confrontati 2 diversi *kit*, il *QIAamp DNA Blood Midi Kit* (Qiagen, Hilden, Germania) e l'*EXTRAgen kit* (Amplimedical, Torino, Italia).

Per valutare il più adatto è stato necessario stimare il numero di genomi equivalenti estratti con i due diversi *kit* attraverso l'amplificazione standardizzata con *real time* PCR di una sequenza di beta-actina. Dall'esperimento è risultato che l'*EXTRAgen kit* estrae in maniera più efficiente il DNA da siero rispetto al *QIAamp DNA Blood Midi Kit* (figura 4.1). Per questo motivo per il nostro studio è stato deciso di utilizzare l'*EXTRAgen kit* per estrarre il DNA dal siero di donne gravide.

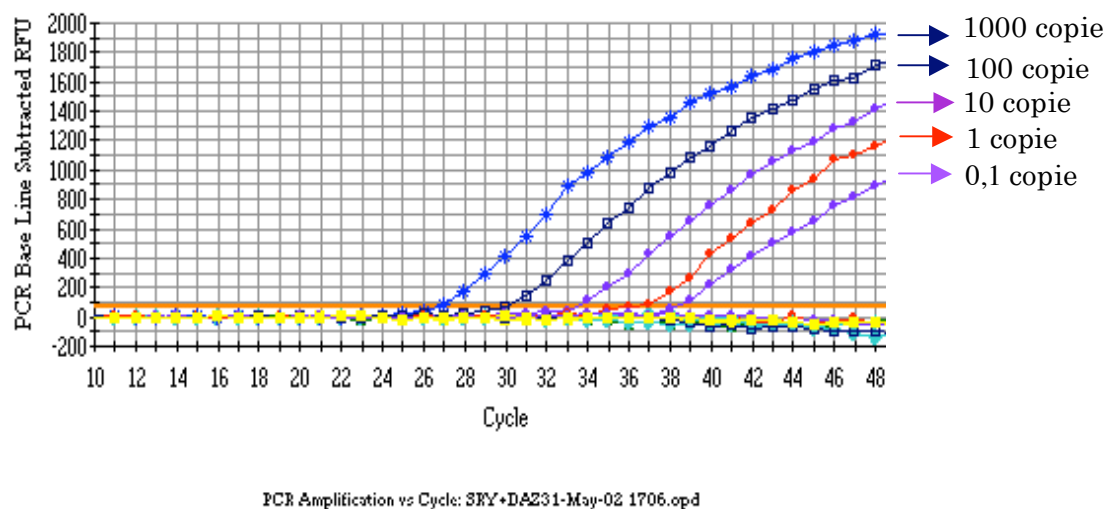


**Figura 4.1** La figura mostra come l'*EXTRAgen* kit estragga il DNA dal siero più efficacemente rispetto al *QIAamp DNA Blood Midi Kit*. Infatti estraendo gli stessi campioni con i due diversi kit, i Ct in corrispondenza dei quali inizia la fase di amplificazione esponenziale sono più elevati per i DNA estratti con *QIAamp DNA Blood Midi Kit*. Questo significa che la quantità di DNA estratto con questo kit è minore rispetto a quella estratta con l'*EXTRAgen* kit.

#### 4.2 Verifica della sensibilità della reazione

La sensibilità della reazione è stata valutata amplificando una scala di diluizione a concentrazione nota di DNA. In particolare sono state amplificate soluzioni di DNA maschile contenenti 1000, 100, 10, 1 e 0,1 copie, diluite in 10000 copie di DNA femminile. La sensibilità della *real time* PCR è risultata estremamente elevata, essendo in grado di rilevare fino a 0,1 copie di DNA, come mostrato in figura 4.2.

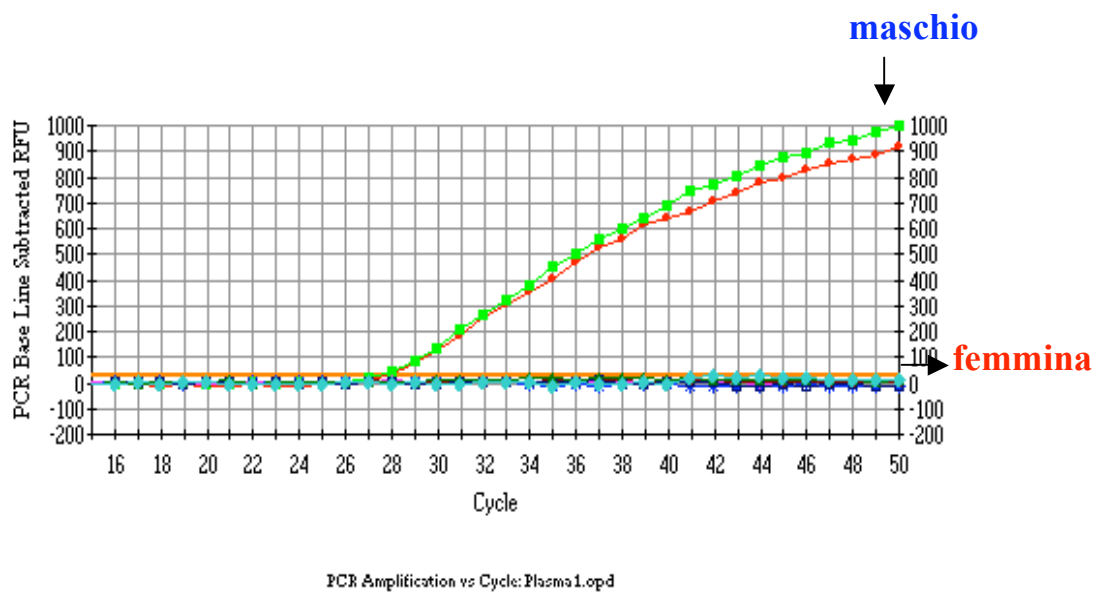




**Figura 4.2** La figura mostra l'elevata sensibilità della sonda in grado di rilevare fino a 0,1 copie di DNA genomico maschile nel siero di donna.

#### 4.3 Verifica della specificità di primers e sonda.

Per verificare la specificità dei *primers* e della sonda progettati, cioè per valutare se questi oligonucleotidi fossero effettivamente specifici per sequenze presenti solo sul cromosoma Y, sono state eseguite delle reazioni di amplificazione in *real time*, utilizzando come stampo sia DNA maschile che DNA femminile. I risultati di tali reazioni dimostrano la specificità dei *primers* e della sonda progettati, come mostrato in figura 4.3. Infatti se essi amplificassero altre sequenze su autosomi si dovrebbe ottenere un segnale anche quando è utilizzato DNA estratto dal siero di individui femmine.



**Figura 4.3** La figura mostra la specificità della sonda per il DNA maschile

#### 4.4 Analisi di delezione del gene DAZ

La regione DAZ è stata amplificata con successo in tutti i 100 individui maschi fertili analizzati come controllo per escludere la presenza di delezioni frequenti a carico di tale regione nei soggetti normali. In particolare per ogni campione sono state utilizzate due diluizioni di DNA stampo, una contenente 10 copie di DNA e l'altra contenete 1 copia di DNA. L'amplificazione di entrambe le diluizioni in tutti i campioni analizzati ha permesso di dimostrare la validità e l'adeguatezza della sonda per il rilevamento e la quantificazione del DNA embrio-fetale libero.

#### *4.5 Definizione del sesso fetale e quantificazione del DNA embrio-fetale tramite real time PCR*

Delle 57 donne analizzate 8 hanno avuto un aborto spontaneo, 26 hanno partorito un feto femmina e 23 un feto maschio. Delle 13 donne portatrici di un feto a rischio per una malattia *X-linked*, 5 erano in attesa di un feto femmina e 8 di un feto maschio.

In tabella 4.1 sono riassunti i risultati ottenuti dall'analisi delle 57 donne gravide. Come si può vedere è stato possibile rilevare il DNA embrio-fetale libero nel siero materno già a partire dalla quinta settimana di gestazione. Infatti in due su tre donne portatrici di un feto maschio le sequenze DAZ sono state amplificate con successo. Questo dato permette di affermare che la comparsa del DNA embrio-fetale libero nella circolazione materna avviene in epoca precoce, ma con un'entità variabile da donna a donna, come dimostrato dal fatto che in un campione non è stato possibile rilevarlo, con conseguente diagnosi errata di feto femmina. Il DNA embrio-fetale è stato amplificato con successo anche in sesta e settima settimana, in particolare il sesso maschile è stato correttamente diagnosticato in 5 su 6 pazienti portatrici di un feto maschio in entrambe le settimane. A partire dalla ottava settimana il DNA embrio-fetale libero è risultato rilevabile in tutte le donne analizzate in attesa di un feto maschio, senza alcun caso di falso negativo. Dai risultati ottenuti quindi si evince che la sensibilità della reazione, corrispondente al numero dei maschi correttamente identificati dal test sul totale dei maschi, è pari al 66% in quinta settimana, all'83% in sesta e settima settimana e al 100% a partire dalla ottava settimana; la specificità invece, definita come il numero di femmine correttamente individuate dal test sul totale delle femmine, si conferma molto elevata, infatti in tutte le settimane è sempre pari al 100%, dal momento che in nessun caso un feto femmina è stato erroneamente diagnosticato come maschio. Questo significa che a partire dalla ottava settimana di gestazione è possibile

fare diagnosi di sesso fetale con una sensibilità del 100%, contro il 66 e l'83% rispettivamente di quinta e sesta e settima settimana.

Ogni campione è sempre stato analizzato in triplicato e il sesso maschile è stato attribuito solamente quando in tutte e tre le repliche è stata rilevata amplificazione di DNA.; le tre repliche hanno sempre dato risultato concordante nei feti maschi, anche in quei casi in cui è stato erroneamente attribuito il sesso femmina, ovvero in nessuna delle tre repliche si è avuta amplificazione del DNA. I casi in cui è stato rilevato un segnale positivo sono stati correttamente diagnosticati come femmina.

epoca gestazionale in settimane	casi esaminati	DAZ+	DAZ-	falsi DAZ+	falsi DAZ-	sensibilità	specificità
5	5	2	2	0	1	66	100
6	10	4	5	0	1	83	100
7	17	11	5	0	1	83	100
8	16	7	9	0	0	100	100
9	20	10	10	0	0	100	100
10	16	10	6	0	0	100	100
11	11	6	5	0	0	100	100
12	12	8	4	0	0	100	100

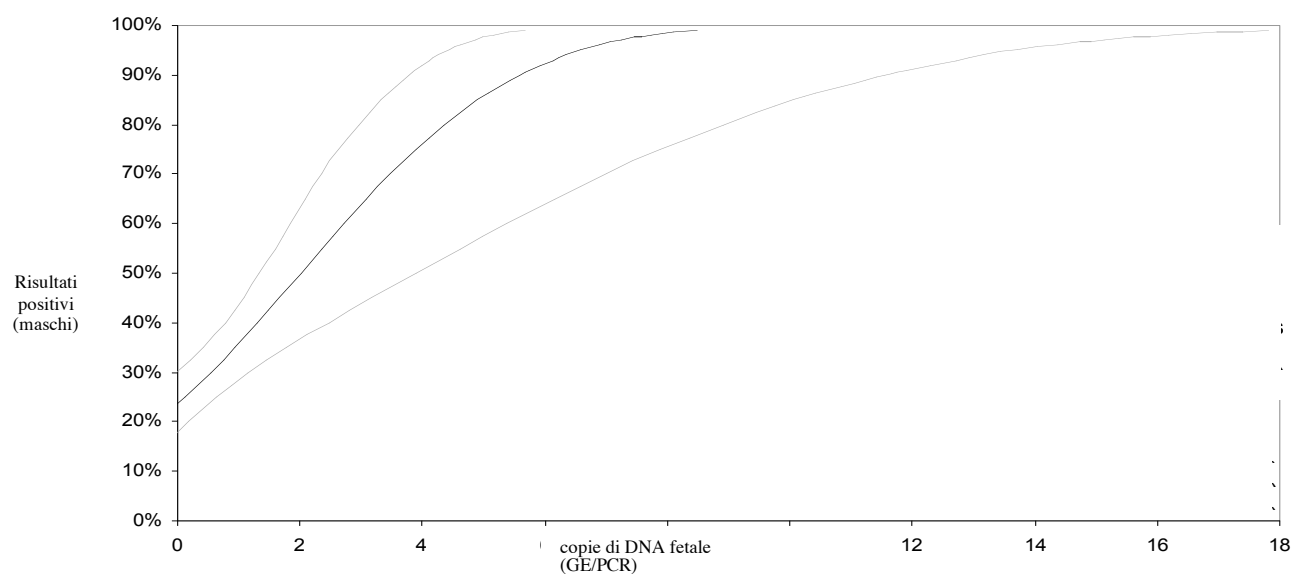
**Tabella 4.1** Riassunto dei risultati dell'analisi delle 57 donne gravide tra la quinta e la settima settimana di gestazione.

Sensibilità, numero di gravidanze DAZ+ correttamente diagnosticate/numero totale di gravidanze con feto maschio

Specificità, numero di gravidanze DAZ - correttamente diagnosticate/numero totale di gravidanze con feto femmina.

Dall'analisi di regressione di *probit* è risultato che la quantità di DNA embrio-fetale libero con cui è possibile fare diagnosi di sesso maschile con una probabilità del 95% è 6,6 genomi equivalenti per PCR per campione (figura 4.4 e Tabella 4.2), ovvero quando vengono rilevate tramite *real time* almeno 6,6 genomi equivalenti per PCR per

campione si ha una probabilità pari al 95% che il feto sia maschio.

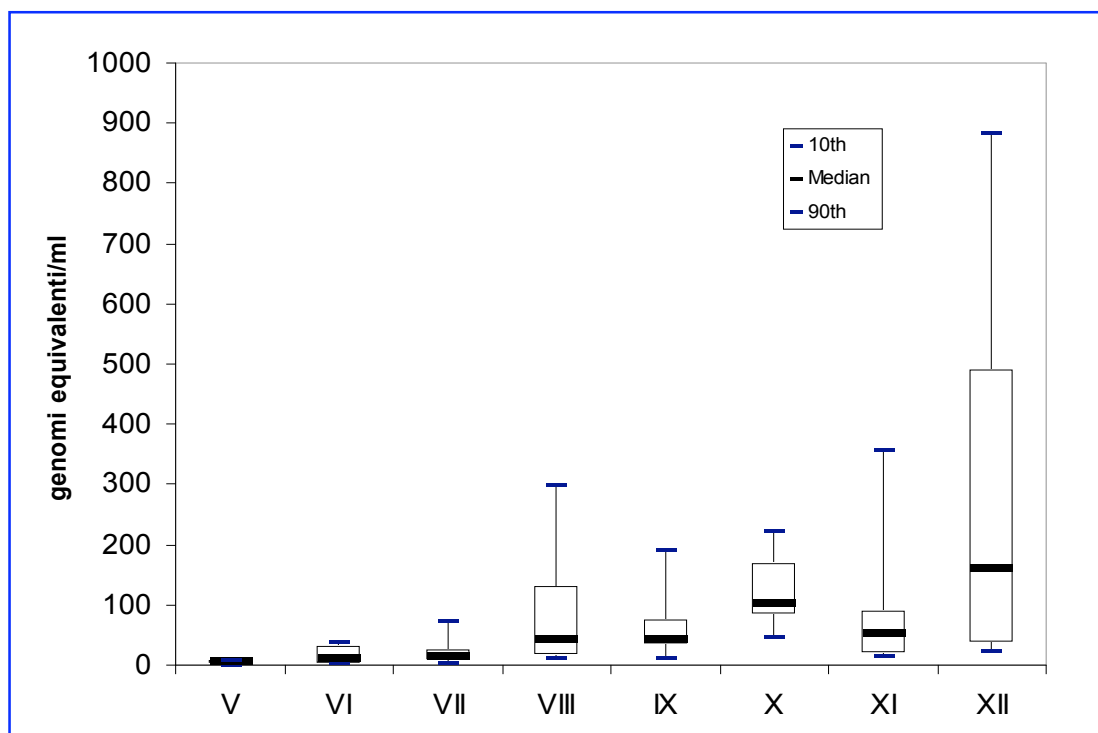


probit %	Input GE (95% CI)
10%	-1.56 (-4.09 to -0.73)
25%	0.12 (-0.68 to 0.62)
50%	2.00 (1.34 to 3.89)
75%	3.89 (2.64 to 7.89)
90%	5.58 (3.76 to 11.53)
95%	6.59 (4.43 to 13.72)
99%	8.49 (5.67 to 17.83)

**Figura 4.4 e Tabella 4.2** Risultati dell'analisi di regressione di *probit*, in cui è riportata la proporzione di risultati positivi (maschi) rispetto al numero di copie di DNA fetale per PCR, espresso in GE/PCR. Le linee più esterne grigie rappresentano l'intervallo di confidenza al 95%. La tabella riporta i dati numerici dei principali punti della curva

Analizzando l'andamento quantitativo del DNA embrio-fetale durante le varie settimane di gestazione nel primo trimestre è stato evidenziato un suo progressivo aumento col procedere della gravidanza, confermando quanto già riportato in altri studi per quanto

riguarda il secondo e il terzo trimestre (fig 4.5). In particolare dall'analisi di regressione lineare di Pearson risulta una buona correlazione tra la quantità di DNA e il trascorrere della gravidanza, espressa dal coefficiente di correlazione  $r = 0.85$  ( $P = 0.008$ ). Questo potrebbe almeno in parte spiegare il motivo per cui il sesso fetale viene correttamente diagnosticato con una sensibilità del 100% a partire dalla ottava settimana: infatti è possibile che sia proprio da questo momento in poi che il DNA raggiunge una quantità tale da poter essere sempre rilevata.

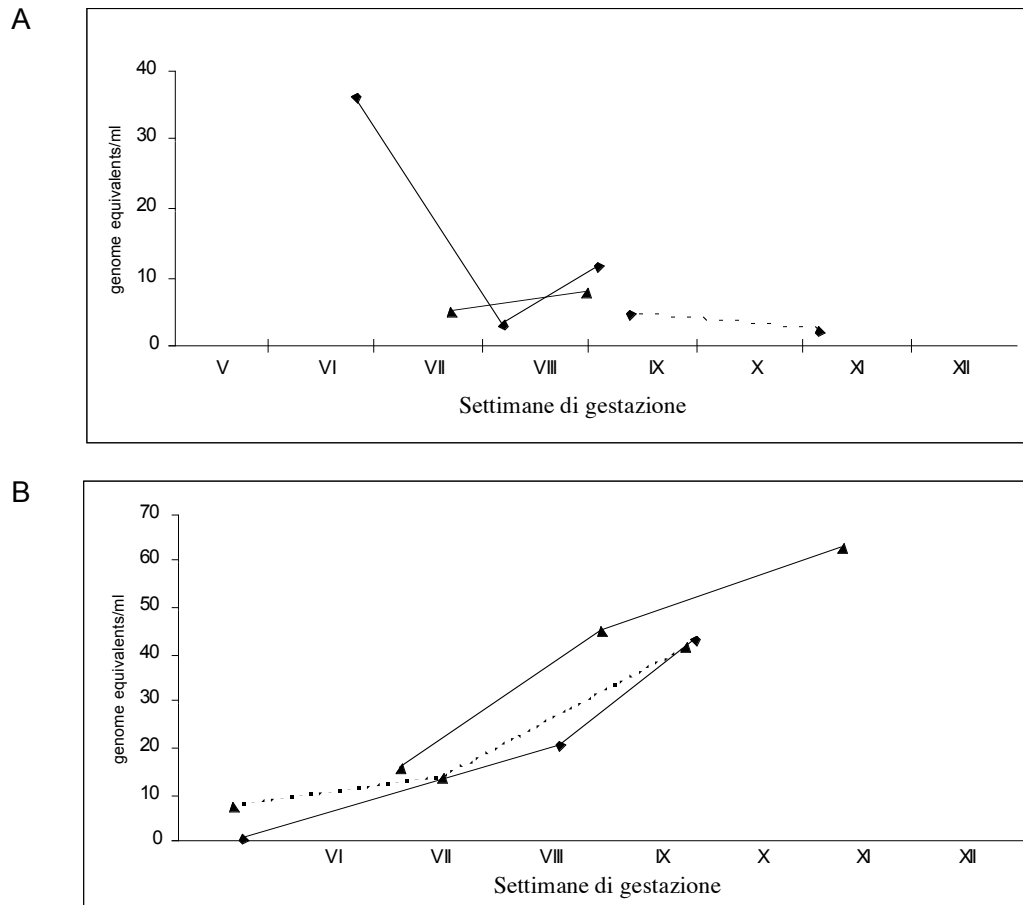


Set gestazionale	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	Totale
Numero di casi	3	6	6	9	10	6	5	4	49
Conc. media	<b>5.0</b>	<b>17.2</b>	<b>30.3</b>	<b>124.3</b>	<b>75.0</b>	<b>123.8</b>	<b>140.9</b>	<b>369.3</b>	<b>110.7</b>
SD	4.4	17.6	44.2	195.9	81.7	87.6	233.1	529.1	149.2
mediana	<b>7.2</b>	<b>12.0</b>	<b>14.8</b>	<b>45.2</b>	<b>44.4</b>	<b>103.4</b>	<b>52.4</b>	<b>159.4</b>	<b>54.8</b>
Range	0-7.9	0-40	0-118.4	3.3-612	4.96-275	7.1-258	12.8-612	14.3-1144	0-1144
Ct medio	36.9	35.9	34.6	32.7	33.4	32.9	32.0	30.2	33.6
CV% medio	88.0	102.3	145.9	157.5	108.9	70.4	165.4	143.3	122.7

**Figura 4.5** *Box plot* rappresentante l'andamento quantitativo del DNA embrio-fetale libero nel corso delle varie settimane del primo trimestre di gravidanza. Nel grafico sono riportati la mediana (all'interno dei *box*), il 25° e il 75° percentile (le linee che delimitano di *box* superiormente e inferiormente) e il 10° e il 90° percentile. I dati numerici relativi alla concentrazione media, alla mediana e alla deviazione standard sono riportati nella tabella sotto il grafico.

In figura 4.6 è mostrato l'andamento della quantità del DNA embrio-fetale libero nei tre casi di aborto spontaneo in cui le pazienti erano portatrici di un feto maschio (A), messo a confronto con l'andamento del DNA in tre casi di gravidanze normali (B). Nei tre casi di aborto sembrerebbe avvenire una diminuzione dei livelli di

DNA circolante subito prima che venga fatta la diagnosi di morte fetale. Per confermare questa speculazione però si rendono necessari ulteriori studi su una casistica più ampia.



**Figura 4.6** A) Andamento del DNA embrio-fetale libero nelle tre gravidanze terminate in un aborto spontaneo in confronto B) con l'andamento del DNA embrio-fetale libero in tre gravidanze normali.



## 5. DISCUSSIONE

Il DNA embrio-fetale libero nel plasma/siero materni rappresenta un'importante fonte di materiale genetico fetale da utilizzare nella diagnosi prenatale non invasiva. Per poter sviluppare strategie diagnostiche da utilizzare in larga scala è necessario stabilire se il DNA embrio-fetale libero è presente in quantità sufficienti in tutte le donne gravide ed è necessario anche stabilire il momento ottimale per il prelievo del sangue materno, cioè il momento in cui certamente il DNA è presente e rilevabile, per non incorrere in errori diagnostici. Per questo motivo sono state realizzate numerose ricerche finalizzate a studiare l'andamento quantitativo del DNA embrio-fetale libero durante le varie epoche gestazionali e il momento della sua comparsa nel sangue materno.

L'amplificazione tramite *real time* PCR di sequenze specifiche del cromosoma Y dal plasma/siero di donne gravide portatrici di un feto maschio rappresenta il metodo di elezione per lo studio del DNA embrio-fetale libero. La maggior parte dei lavori pubblicati in letteratura si basa sul rilevamento del DNA attraverso l'utilizzo di sonde a singolo gene: in particolare SRY è il gene più ampiamente usato a questo scopo. In molti studi sono state raggiunte una sensibilità e una specificità superiori al 95%, anche nel primo trimestre di gravidanza (Sekizawa et al., 2001a; Birch et al., 2005; Rijnders et al., 2004). Ciò nonostante uno studio multicentrico ha recentemente evidenziato una elevata variabilità interlaboratorio proprio per quanto riguarda la sensibilità di rilevamento del DNA embrio-fetale libero, che oscilla tra il 31 e il 97% (Johnson et al., 2004). Per superare tale variabilità e potenziare la riproducibilità dell'analisi quantitativa del DNA embrio-fetale libero, soprattutto nel primo trimestre di gravidanza quando il DNA è poco rappresentato, alcuni gruppi hanno adottato l'utilizzo di sonde multiple, cioè complementari a più di una sequenza sul cromosoma Y, che hanno

permesso loro di rilevare quantità di DNA embrio-fetale dieci volte inferiori rispetto alle quantità rilevabili attraverso l'utilizzo di sonde a singolo gene usate nei lavori precedenti (Zimmermann et al., 2005).

Nonostante numerosi studi siano stati realizzati allo scopo di monitorare la quantità di DNA embrio-fetale durante le varie epoche gestazionali, i dati relativi alla sua comparsa e alla sua quantità nel primo trimestre di gravidanza sono ancora pochi. Lo scopo di tale studio è consistito nella quantificazione tramite *real time* PCR del DNA embrio-fetale libero nel siero materno proprio nel primo trimestre attraverso l'utilizzo di una nuova sonda multipla dotata di una maggiore sensibilità e in grado quindi di amplificare anche piccole quantità di DNA, come all'inizio della gravidanza.

La nuova sonda multipla utilizzata in questo studio consiste in una sequenza di DNA complementare ai geni DAZ (*Deleted in Azoospermia*), DAZ1, DAZ2, DAZ3 e DAZ4, localizzati sul braccio lungo del cromosoma Y, nella regione AZFc. La fase iniziale della ricerca quindi è stata dedicata a dimostrarne l'affidabilità, la sensibilità e la specificità al fine di utilizzarla per il nostro scopo. L'assenza di delezione a carico della regione DAZ in tutti i 100 campioni maschi fertili analizzati ha permesso di dimostrare l'affidabilità di questa sonda per quanto riguarda il rilevamento del DNA embrio-fetale libero, con un rischio minimo di errore nella diagnosi di sesso fetale dovuto all'insorgenza di delezioni *de novo* che avvengono con una frequenza di 1/4000 (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001). Tale sonda è risultata essere anche altamente specifica, essendo in grado di amplificare DNA genomico maschile ma non femminile; inoltre utilizzando una scala di diluizione di DNA genomico maschile da 1000 a 0,1 copie è stata dimostrata anche la sua elevata sensibilità, essendo in grado di rilevare quantità di DNA maschile inferiori a un genoma.

Nella fase successiva della ricerca la nuova sonda multipla è stata applicata per fare diagnosi di sesso fetale ad una casistica di 57 donne gravide tra la quinta e la dodicesima settimana. Dai risultati

ottenuti è emerso che il DNA embrio-fetale libero è rilevabile già a partire dalla quinta settimana di gravidanza. Questo dato ha un duplice significato. Da una parte indica che la comparsa del DNA embrio-fetale avviene in epoca molto precoce, proprio all'inizio della gravidanza; dall'altra parte conferma l'elevata sensibilità della sonda multipla nel rilevare il DNA embrio-fetale. I tre falsi negativi ottenuti in quinta, sesta e settima settimana potrebbero essere riconducibili o alla presenza di quantità di DNA talmente scarse da superare la sensibilità della sonda oppure all'assenza del DNA embrio-fetale in quel momento e alla sua comparsa in una fase successiva. Infatti è stata ampiamente documentata l'esistenza di una grande variabilità in termini di concentrazione e momento di comparsa del DNA embrio-fetale tra le donne gravide.

L'aumento della sensibilità raggiunto con la sonda DAZ rispetto alla sonda SRY si riflette in un altro dato. In due studi indipendenti del 2005 la mediana della concentrazione del DNA embrio-fetale libero nel primo trimestre di gravidanza risulta pari a 9,1 GE/ml e 15,9GE/ml (Galbiati et al., 2005; Birch et al., 2005) contro i 54,9 GE/ml ottenuti in questo studio. D'altra parte però l'analisi di regressione di *probit* ha fissato a 6,6 GE/PCR il LoD per assegnare il sesso maschile con una probabilità del 95%. Questo valore è ben più alto rispetto a quello riportato in uno studio recente in cui è stata utilizzata un'altra sonda multipla, DYS14, dove il LoD al 95% viene fissato a 0,35 GE/PCR (Zimmerman et al., 2005). Questo dato può essere spiegato sia dall'utilizzo di diverse condizioni sperimentali oppure da una reale maggiore sensibilità della sonda DYS14 rispetto a DAZ, dovuta al fatto che la sonda DYS14 dà origine a 9 ampliconi con un'identità del 100% rispetto alla sequenza bersaglio contro i 5 prodotti con la nostra sonda. Poiché questo studio del 2005 è stato realizzato su una casistica molto ristretta, altri studi sono sicuramente necessari per comprendere il motivo di tale differenza.

Nessun caso di falso positivo è stato ottenuto, per cui la specificità del test è stata del 100% durante l'intero periodo di

gravidanza esaminato. A partire dall'ottava settimana non è stato registrato nessun caso di falso negativo. Ciò significa che il DNA embrio-fetale è stato rilevato in tutte le gravidanze con feto maschi e il sesso fetale è stato sempre correttamente diagnosticato, con una sensibilità del 100%. Altri studi che utilizzano la sonda SRY sono in grado di raggiungere una sensibilità del 100% a partire dalla nona settimana di gravidanza (Rijnders et al, 2003). Il fatto che in questo studio il raggiungimento del 100% della sensibilità nella diagnosi di sesso fetale sia anticipato all'ottava settimana risulta di notevole rilievo in quei casi in cui conoscere precocemente il sesso del feto permette di anticipare l'indagine genetica all'inizio della gravidanza rendendo possibile un intervento tempestivo, inteso sia come inizio di cure o profilassi, sia come ulteriori indagini. La determinazione del sesso fetale è fondamentale nella gestione delle malattie *X-linked*. Per le donne gravide portatrici di un feto a rischio per una malattia *X-linked* conoscere precocemente il sesso del feto permette di procedere con il prelievo dei villi coriali per individuare il difetto genetico nel caso che il feto sia maschio e di evitare il prelievo dei villi coriali, evitando il rischio di aborto ad esso associato, nel caso che il feto sia femmina. Infatti in questo caso il feto al massimo sarà portatore della malattia, per cui la villocentesi non è necessaria. Inoltre solo per una piccola percentuale delle malattie recessive *X-linked* note è disponibile un test molecolare specifico. Questo significa che per tutte le altre la determinazione del sesso del feto rappresenta l'unica informazione disponibile utile a fini diagnostici. Delle 57 donne analizzate in questo studio 13 erano a rischio di portare un feto con una malattia *X-linked*. A otto donne è stato correttamente diagnosticato un feto maschio e a cinque è correttamente diagnosticato un feto femmina. Sulla base di questo risultato queste ultime hanno potuto evitare la villocentesi.

La determinazione precoce del sesso fetale trova applicazione anche alle gravidanze a rischio per la sindrome adrenogenitale. In questa sindrome, causata da deficit di 21-idrossilasi, il feto femmina sviluppa virilizzazione dei genitali esterni. Per prevenire tale

virilizzazione la madre viene trattata con desametazone sin dall'inizio della gravidanza; la terapia viene sospesa una volta che sia stato stabilito il sesso maschile del feto. La determinazione non invasiva del sesso in questo caso potrebbe permettere di evitare il trattamento delle donne gestanti feto maschi e quindi evitare gli effetti collaterali associati alla terapia.

L'andamento quantitativo del DNA embrio-fetale libero evidenziato in questo studio conferma l'andamento già descritto in altri lavori per il secondo e il terzo trimestre, ovvero un incremento progressivo con il trascorrere delle settimane (Lo et al., 1998; Ariga et al., 2001; Lee et al., 2002; Chan et al., 2003). Questo potrebbe almeno in parte spiegare il fatto che è possibile diagnosticare il sesso fetale con un'accuratezza del 100% a partire dalla ottava settimana di gestazione: molto probabilmente infatti è proprio da questo momento in poi che il DNA embrio-fetale raggiunge una concentrazione tale da poter essere sempre rilevata. Una diminuzione nella quantità DNA embrio-fetale è stata registrata nei casi di aborto spontaneo immediatamente prima che venisse fatta la diagnosi di aborto. A questo proposito si potrebbe ipotizzare che l'interruzione degli scambi tra il feto e la madre attraverso la placenta si rifletta in una diminuzione dei livelli di DNA embrio-fetale libero nel sangue materno. Dal momento che i dati relativi al comportamento del DNA embrio-fetale in questa circostanza si riferiscono a pochi casi, per poter essere confermati è necessario condurre uno studio mirato su una casistica più ampia, tanto più che questi risultati sembrerebbero essere in contrasto con un recente studio in cui è stato evidenziato un repentino aumento della concentrazione del DNA embrio-fetale libero proprio prima della morte intrauterina del feto (Zhong et al., 2006) e con un altro studio in cui nelle donne sottoposte a interruzione volontaria della gravidanza si evidenzia un aumento dei livelli di DNA embrio-fetale circolante che tende a mantenersi per alcuni giorni nel caso di interruzione non chirurgica (Wataganara et al., 2004).

## 6. CONCLUSIONI

La scoperta della presenza del DNA embrio-fetale libero nella circolazione materna è relativamente recente, risalendo all'incirca a un decennio fa. Dal momento della sua scoperta fino ad ora il DNA embrio-fetale libero è stato oggetto di numerosissime applicazioni, tutte finalizzate allo sviluppo di nuove strategie nell'ambito della diagnosi prenatale non invasiva. In tale contesto lo scopo della nostra ricerca è consistito nella quantificazione del DNA embrio-fetale libero nel primo trimestre di gravidanza e nella determinazione del momento della sua comparsa nella circolazione materna, per individuare il momento ottimale per il prelievo del sangue materno da cui estrarre il DNA per effettuare indagini genetiche.

Questo studio è stato realizzato utilizzando la *real time* PCR e una nuova sonda progettata su sequenze multiple di DNA, specifiche solo del cromosoma Y, rappresentate dai geni della famiglia DAZ (DAZ1, DAZ2, DAZ3, DAZ4). Le sonde multiple presentano una maggiore sensibilità nel rilevamento del DNA rispetto alle sonde a singolo gene generalmente utilizzate e sono quindi in grado di amplificare anche piccole quantità di DNA, come quelle presenti all'inizio della gravidanza.

Dai risultati ottenuti applicando la nuova sonda DAZ, per determinare il sesso del feto, in una casistica di 57 donne gravide tra la quinta e la dodicesima settimana è possibile concludere che:

1. il DNA embrio-fetale libero è rilevabile nella circolazione materna molto precocemente, già a partire dalla quinta settimana, con grande variabilità interindividuale, dal momento che non in tutte le donne gravide è presente in quinta settimana
2. dalla ottava settimana il DNA embrio-fetale libero è sempre rilevabile, per cui è possibile fare diagnosi di sesso fetale con

un'accuratezza del 100%. Questa precocità nella determinazione del sesso fetale risulta fondamentale nella gestione delle malattie *X-linked*, per decidere se fare o evitare il prelievo dei villi coriali, che sono un procedimento invasivo associato a rischio di aborto.

3. la concentrazione del DNA embrio-fetale libero aumenta progressivamente durante la il primo trimestre di gravidanza, confermando quanto già riportato in letteratura per il secondo trimestre.
4. nei casi di aborto spontaneo sembrerebbe verificarsi una diminuzione nella quantità DNA embrio-fetale proprio prima che venga fatta la diagnosi di aborto, ma quest'ultimo dato richiede necessariamente l'osservazione di altri casi. (Stanghellini et al., 2006).

La dimostrazione della presenza di quantità relativamente elevate di DNA embrio-fetale libero nella circolazione materna già all'inizio della gravidanza conferma la possibilità di un suo impiego nello sviluppo di strategie per la diagnosi prenatale non invasiva, anche se numerosi altri sforzi dovranno ancora essere fatti per superare i limiti rappresentati dalla difficoltà di distinguerlo dal *background* materno, che preclude numerose applicazioni.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Al-Mufti R, Lees C, Albaiges G, Hambley H, Nicolaides KH. (2000a) Fetal cells in maternal blood of pregnancies with severe fetal growth restriction.  
*Hum Reprod.* **15**: 218-21.
- Al-Mufti R, Hambley H, Albaiges G, Lees C, Nicolaides KH. (2000b) Increased fetal erythroblasts in women who subsequently develop pre-eclampsia.  
*Hum Reprod.* **15**: 1624-8.
- Altschul SF., Gish W., Miller W., Myers EW., Lipman DJ. (1990) “Basic local alignment search tool”.  
*J.Mol.Biol.* **215**: 403-10
- Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. (2000) Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma.  
*Clin Chem.* **46**: 301-2.
- Anker P., Lefort, Vasioukhin V., Lyautey J., Lederry C., Chen X.Q., Strium M., et al. (1997) “K-ras mutation are found in DNA extracted from plasma of patients with colorectal cancer”  
*Gastroenterology* **112**: 1114-20
- Ariga H, Ohto H, Busch MP, Imamura S, Watson R, Reed W, Lee TH. (2001) Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis.  
*Transfusion* **41**: 1524-30.
- Bartha JL, Finning K, Soothill PW. (2003) Fetal sex determination from maternal blood at 6 weeks of gestation when at risk for 21-hydroxylase deficiency.  
*Obstet Gynecol.* **101**: 1135-6.
- Bauer M, Hutterer G, Eder M, Majer S, Leshane E, Johnson KL, Peter I, Bianchi DW, Pertl B. (2006) A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator



for adverse pregnancy outcome.

*Prenat Diagn.* **26**: 831-6.

- Bianchi D.W., Flint A.F., Pizzimenti M.F., Knoll J.H.M., Latt S.A. (1990) "Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood"  
*Proc. Natk. Acad. Sci. USA.* **87**: 3279-3283
- Bianchi D.W., Shuber A.P., De Maria M., Fougner A.C., Klinger K.W. (1994) "Fetal cells in maternal blood: determination of purity and yield by quantitative polymerase chain reaction"  
*Am J Obstet Gynecol* **171**: 922-926
- Bianchi DW. (1995) Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood.  
*J Pediatr.* **127**: 847-56.
- Bianchi D.W., Zickwolf G.K., Weil G.J., Sylvester S., De Maria M. (1996) "Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years post-partum"  
*Proc Natl Acad Sci USA.* **93**: 705-708
- Bianchi D.W., Williams J.M., Sullivan L.M., Hanson F.W., Klinger K.W., Shuber A.P. (1997) "PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies"  
*Am J Hum Genet.* **61**: 822-829
- Bianchi DW and Farina A. (1998) Fetal cells in maternal blood as a second non-invasive step for fetal Down syndrome screening.  
*Prenat Diagn.* **18**: 983-4.
- Bianchi DW, LeShane ES, Cowan JM. (2001) Large amounts of cell-free fetal DNA are present in amniotic fluid.  
*Clin Chem.* **47**: 1867-9.
- Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Elias S, Holzgreve W, Evans MI, Dukes KA, Sullivan LM, Klinger KW, Bischoff FZ, Hahn S, Johnson KL, Lewis D, Wapner RJ, de la Cruz F. (2002) Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study.  
*Prenat Diagn.* **22**: 609-15.

- Birch L, English CA, O'Donoghue K, Barigye O, Fisk NM and Keer JT (2005) Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation.  
*Clin Chem.* **51**: 312–20.
- Busch J, Huber P, Pfluger E, Miltenyi S, Holtz J, Radbruch A. (1994a) Enrichment of fetal cells from maternal blood by high gradient magnetic cell sorting (double MACS) for PCR-based genetic analysis.  
*Prenat Diagn.* **14**: 1129-40.
- Busch J, Huber P, Holtz J, Pfluger E, Radbruch A. (1994b) Simple and fast "double-MACS" sorting of fetal erythroblasts from maternal blood for PCR-based paternity analysis.  
*Ann N Y Acad Sci.* **7**: 144-6.
- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. (2001) Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow.  
*Blood.* **98**: 2396-402.
- Capone R.B., et al. (2000) "Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma"  
*Clin. Cancer Res.* **6**: 4171-75
- Chan LY, Leung TN, Chan KC, Tai HL, Lau TK, Wong EM, Lo YM. (2003) Serial analysis of fetal DNA concentrations in maternal plasma in late pregnancy.  
*Clin Chem.* **49**: 678-80
- Chan LY., Zhang J., Hui AB., Wong N., Lau TK., Leung TN., Lo KW., Huang DW., Lo YM (2004) Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma.  
*Clin. Chem* **50**: 88-92
- Chan KC, Ding C, Geroiassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, Lau TK, Chim SS, Chung GT, Nicolaides KH, Lo YM. (2006) Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis  
*Clin Chem.* **52**: 2211-8.

- Chen X.Q., Stroun M., Magnenat J-L., Nicod L.P., Kurt A-M., Lyautey J., Lederry C., et al. (1996) “Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients”  
*Nat Med.* **2**: 1033-35
- Chiang P.W., et al. (1999) “Detection of erbB-2 amplifications in tumors and sera from esophageal carcinoma patients”  
*Clin. Cancer Res.* **5**: 1381-86
- Chim SS, Tong YK, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LY, Oudejans CB, Ding C, Lo YM.(2005) Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**: 14753-8.
- Chiu RW, Lau TK, Cheung PT, Gong ZQ, Leung TN, Lo YM. (2002a) Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study.  
*Clin Chem.* **48**: 778-80.
- Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YM. (2002b) Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma.  
*The Lancet* **360**: 998-1000.
- Choolani M, O'Donoghue K, Talbert D, Kumar S, Roberts I, Letsky E, Bennett PR, Fisk NM. (2003) Characterization of first trimester fetal erythroblasts for non-invasive prenatal diagnosis.  
*Mol Hum Reprod.* **9**: 227-35.
- Chua, S., Wilkins, T., Sargent, I. & Redman, C. (1991) Trophoblast deportation in pre-eclamptic pregnancy.  
*British Journal of Obstetrics and Gynaecology* **98**: 973–79.
- Ciaranfi A., Cyrchod A., Odartchenko N. (1977) “Survie de lymphocytes dans le sang maternel post-partum”  
*Schweiz Med Wochenschr.* **107**:134-43
- Ding C, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LC, Chan AY, Charoenkwan P, Ng IS, Law HY, Ma ES, Xu X, Wanapirak C, Sanguansermsri T, Liao C, Ai MA, Chui DH, Cantor CR, Lo YM. (2004) MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis.

- Durrant L, McDowall K, Holmes R, Liu D. (1996) Non-invasive prenatal diagnosis by isolation of both trophoblasts and fetal nucleated red blood cells from the peripheral blood of pregnant women.  
*Br J Obstet Gynaecol.* **103**: 219-22.
- Eridani S, Mazza U, Massaro P, La Targia ML, Maiolo AT, Mosca A. (1998) Cytokine effect on ex vivo expansion of haemopoietic stem cells from different human sources.  
*Biotherapy.* **11**: 291-6
- Falcidia E, Parano E, Grillo A, Pavone P, Takabayashi H, Trifiletti RR, Scollo P, Dallapiccola B, Grammatico P, Novelli A, Paladini D, Monni G, Gulisano A, Scassellati G. (2004) Fetal cells in maternal blood: a six-fold increase in women who have undergone amniocentesis and carry a fetus with Down syndrome: a multicenter study.  
*Neuropediatrics.* **35**: 321-4.
- Farina A, Caramelli E, Concu M, Sekizawa A, Ruggeri R, Bovicelli L, Rizzo N, Carinci P.(2002) Testing normality of fetal DNA concentration in maternal plasma at 10-12 completed weeks' gestation: a preliminary approach to a new marker for genetic screening.  
*Prenat Diagn.* **22**: 148-52.
- Farina A, LeShane ES, Romero R, Gomez R, Chaiworapongsa T, Rizzo N, Bianchi DW. (2005) High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a risk factor for spontaneous preterm delivery  
*Am J Obstet Gynecol.* **193**: 421-5.
- Farina A, LeShane ES, Lambert-Messerlian GM, Canick JA, Lee T, Neveux LM, Palomaki GE, Bianchi DW.(2003) Evaluation of cell-free fetal DNA as a second-trimester maternal serum marker of Down syndrome pregnancy.  
*Clin Chem.* **49**: 239-42.
- Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND.(2002) Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service.  
*Transfusion.* **42**: 1079-85

- Finning K, Martin P, Daniels G.(2004) A clinical service in the UK to predict fetal Rh (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma.  
*Ann N Y Acad Sci.* **1022**: 119-23
- Flori E, Doray B, Gautier E, Kohler M, Ernault P, Flori J, Costa JM. (2004) Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytio-trophoblastic cells. Case report.  
*Hum Reprod.* **19**: 723-4.
- Fucharoen G, Tungwiwat W, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. (2003) Prenatal detection of fetal hemoglobin E gene from maternal plasma.  
*Prenat Diagn.* **23**: 393-6.
- Galbiati S, Smid M, Gambini D, Ferrari A, Restagno G, Viora E, Campogrande M, Bastonero S, Pagliano M, Calza S et al. (2005) Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation.  
*Hum Genet.* **117**: 243–48.
- Gänshirt Ahlert D., Burschky M., Garritsen H.S.P., et al. (1992) “Magnetic cell sorting and the transferrin receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood”  
*Am J Obstet Gynecol* **166**: 1350-55
- Gänshirt, D., Garritsen, H.S.P., Miny, P. & Holzgreve, W. (1994) Fetal cells in maternal circulation throughout gestation.  
*The Lancet* **343**: 1038–39.
- Gerovassili A, Garner C, Nicolaides KH, Thein SL, Rees DC.(2007) Free fetal DNA in maternal circulation: a potential prognostic marker for chromosomal abnormalities?  
*Prenat Diagn.* **27**: 104-10.
- Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM and Sorenson GC (1998) “Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls.  
*Pancreas* **17**: 89-97

- Goldberg J.D. (1997) “Fetal cells in maternal circulation: progress in analysis of rare event”  
*Am J Hum Genet.* **61**: 806-9
- Gonzalez-Gonzalez MC, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J, Gallardo E, Ayuso C, Ramos C. (2002) Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma.  
*Prenat Diagn.* **22**: 946-8.
- Gonzalez-Gonzalez MC, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Garcia-Hoyos M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C. (2003a) Huntington disease-unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR.  
*Prenat Diagn.* **23**: 232-4.
- Gonzalez-Gonzalez MC, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Ramos C. (2003b) Early Huntington disease prenatal diagnosis by maternal semiquantitative fluorescent-PCR.  
*Neurology.* **60**: 1214-5
- Guetta E, Gordon D, Simchen MJ, Goldman B, Barkai G (2003) Hematopoietic progenitor cells as targets for non-invasive prenatal diagnosis: detection of fetal CD34+ cells and assessment of post-delivery persistence in the maternal circulation.  
*Blood Cells Mol Dis.* **30**: 13–21
- Guetta E, Simchen MJ, Mammon-Daviko K, Gordon D, Aviram-Goldring A, Rauchbach N, Barkai G. (2004) Analysis of fetal blood cells in the maternal circulation: challenges, ongoing efforts, and potential solutions.  
*Stem Cells Dev.* **13**: 93-9.
- Guetta E, Gutstein-Abo L, Barkai G.(2005) Trophoblasts isolated from the maternal circulation: in vitro expansion and potential application in non-invasive prenatal diagnosis.  
*J Histochem Cytochem.* **53**: 337-9.
- Hamada H., Arinami T., Kubo T., Hamaguchi H., Iwasaki H. (1993) “Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age”  
*Hum Genet.* **91**: 427-32

- Hahn S., Ruppertz B., Holzgreve W. (2005) Fetal cells and cell free fetal nucleic acids in maternal blood: new tools to study abnormal placentation?  
*Placenta*. **26**: 515-26
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. (1996) “Real Time Quantitative PCR”  
*Genome Res.* **6**: 986-94
- Herzenberg L.A., Bianchi D.W., Schroder J., et al. (1979) “Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescent activated cell sorting”  
*Proc Natl Acad Sci USA*. **76**: 1453-1457
- Hibi K., et al. (1998) “Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients”  
*Cancer Res.* **58**: 1405-07
- Holzgreve, W., Ghezzi, F., DiNaro, E., Ganshirt, D., Maymon, E. & Hahn, S. (1998) Feto-maternal cell traffic is disturbed in preeclampsia.  
*Obstetrics and Gynecology* **91**: 669–72.
- Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D, Voslarova S, Calda P, Nekolarova K, Kofer J, Stejskal D, Doucha J, Cinek O, Vavrirec J.(2002) Quantitative analysis of DNA levels in maternal plasma in normal and Down syndrome pregnancies.  
*BMC Pregnancy Childbirth*. **2**: 4.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD and Knippers R (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells.  
*Cancer Res* **61**,1659–65.
- Jansen, M.W., Brandenburg, H., Wildschut, H.I., Martens, A.C., Hagenaars, A.M., Wladimoroff, J.W. & in’t Veld, P.A. (1997) The effect of chorionic villus sampling on the number of fetal cells isolated from maternal blood and on maternal serum alphafetoprotein levels.  
*Prenat Diagn* **17**: 953–9.
- Jansen MW, Korver-Hakkennes K, van Leenen D, Brandenburg

H, Wildschut HI, Wladimiroff JW, Ploemacher RE. (2000) How useful is the in vitro expansion of fetal CD34+ progenitor cells from maternal blood samples for diagnostic purposes?  
*Prenat Diagn.* **20**: 725-31

- Jimbo M, Sekizawa A, Sugito Y, Matsuoka R, Ichizuka K, Saito H, Okai T. (2003) Placenta increta: Postpartum monitoring of plasma cell-free fetal DNA.  
*Clin Chem.* **49**: 1540-1.
- Johnson KL, Dukes KA, Vidaver J, LeShane ES, Ramirez I, Weber WD, Bischoff FZ, Hahn S, Sharma A, Dang DX et al. (2004) Interlaboratory comparison of fetal male DNA detection from common maternal plasma samples by real-time PCR.  
*Clin Chem.* **50**: 516–21.
- Kleihauer E., Braun H., Betke K. (1957) “Demonstration von fetalem hämoglobin in den erythrocyten eines blutausstrichs”  
*Klein. Wochenschr* **15**: 637
- Krabchi K, Gros-Louis F, Yan J, Bronsard M, Masse J, Forest JC, Drouin R. (2001) Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques.  
*Clin Genet.* **60**: 145-50
- Krabchi K, Gadji M, Forest JC, Drouin R. (2006) Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood in different cases of aneuploidies.  
*Clin Genet.* **69**: 145-54.
- Kolvraa S, Christensen B, Lykke-Hansen L, Philip J. (2005) The fetal erythroblast is not the optimal target for non-invasive prenatal diagnosis: preliminary results.  
*J Histochem Cytochem.* **53**: 331-6.
- Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Silber S, Oates R, Rozen S et al. (2001) The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men.  
*Nat Genet.* **29**: 279–86.
- Kutuyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA,



Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J. (2000) 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures.

*Nucleic Acids Res.* **28**: 655-61

- Lau TK, Lo KW, Chan LY, Leung TY, Lo YM. (2002) Cell-free fetal deoxyribonucleic acid in maternal circulation as a marker of fetal-maternal hemorrhage in patients undergoing external cephalic version near term.

*Am J Obstet Gynecol.* **183**: 712-6.

- Lau TW, Leung TN, Chan LY, Lau TK, Chan KC, Tam WH, Lo YM. (2002) Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia.

*Clin Chem.* **48**: 2141-6.

- Lee T, LeShane ES, Messerlian GM, Canick JA, Farina A, Heber WW, Bianchi DW. (2002) Down syndrome and cell-free fetal DNA in archived maternal serum.

*Am J Obstet Gynecol.* **187**: 1217-21.

- Leon SA, Ehrlich GE, Shapiro B, Labbate VA. (1977a) Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients.

*J Rheumatol.* **4**:139-43.

- Leon S.A. et al. (1977b) "Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy"

*Cancer Res.* **37**: 646-50

- Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM. (1998) Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour.

*The Lancet* **354**: 780.

- Leung TN, Zhang J, Lau TK, Chan LY, Lo YM. (2001) Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia.

*Clin Chem.* **47**: 137-9.

- Levine RJ, Qian C, Leshane ES, Yu KF, England LJ, Schisterman EF, Wataganara T, Romero R, Bianchi DW. (2004) Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of

preeclampsia.

*Am J Obstet Gynecol.* **190**: 707-13

- Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W and Hahn S (2004a) Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms.  
*Clin Chem.* **50**: 1002–11.
- Li Y, Holzgreve W, Page-Christiaens GC, Gille JJ, Hahn S. (2004b) Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma. Case report.  
*Prenat Diagn.* **24**: 896-8.
- Li Y, Di Naro E, Vitucci A, Zimmermann B, Holzgreve W, Hahn S. (2005) Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma.  
*JAMA.* **293**: 1728.
- Li Y, Wenzel F, Holzgreve W, Hahn S. (2006a) Genotyping fetal paternally inherited SNPs by MALDI-TOF MS using cell-free fetal DNA in maternal plasma: influence of size fractionation.  
*Electrophoresis.* **27**: 3889-96.
- Li Y, Hahn S, Holzgreve W. (2006b) Recent developments in the detection of fetal single gene differences in maternal plasma and the role of size fractionation.  
*Ann N Y Acad Sci.* **1092**: 285-92
- Li Y., Page-Christiaensen GC., Gille JJ., Holzgreve W., Hahn S. (2007) Non-invasive prenatal detection of achondroplasia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS assay.  
*Prenat Diagn.* **27**: 11-17
- Liou, J.D., Pao, C.C., Hor, J.J. & Kao, S.M. (1993) Fetal cells in the maternal circulation during the first trimester in pregnancies.  
*Human Genetics* **2**: 09–11.
- Little M.T., Langlois S., Wilson R.D., Lansdorp P.M. (1997) “Frequency of fetal cells in sorted subpopulation nucleated erythroid and CD34+ hematopoietic progenitor cells from

maternal peripheral blood”

*Blood.* **89**: 2347-58

- Lo Y.M.D., Patel P., Wainscoat J.S., Sampietro M., Gillmer M.D.G., Fleming K.A. (1989) “Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood”  
*The Lancet* **ii**: 1363-65
- Lo Y.M.D., Patel P., Sampietro M., Gillmer M.D.G., Fleming K.A., Wainscoat J.S. (1990) “Detection of single-copy fetal sequence from maternal blood”  
*The Lancet* **335**: 1463-64
- Lo Y.M.D., Corbetta N., Chamberlain P.F., Rain V., Sargent I.L, Redman C.W.G and Wainscoat J.S. (1997) Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum  
*The Lancet* **350**: 485-87
- Lo Y.M.D., Tein M.S.C., Lau T.K., Haines C.J., Leung T.N., Poon P.M.K., Wainscoat J.S., Johnson P.J., Chang A.M., Hjelm N.M. (1998) “Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for non-invasive prenatal diagnosis”  
*Am J Hum Genet.* **62**: 768-75
- Lo YM, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AM, Hjelm NM, Elmes RS, Bianchi DW. (1999a) Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21.  
*Clin Chem.* **45**: 1747-51
- Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, Haines CJ, Redman CW. (1999b) Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia.  
*Clin Chem.* **45**: 184-8.
- Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. (1999d) Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma.  
*Am J Hum Genet.* **64** :218-24
- Lo Y.M.D. (2001) “Quantitative analysis of Epstein-Barr virus DNA in plasma and serum: applications to tumor detection and monitoring”  
*Ann. N. Y. Acad. Sci.* **45**: 68-72

- Mandel P., Metais P. (1948) “Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l’homme”  
*C.R. Acad. Sci. Paris.* **142**: 241-43
- Mavrou A, Kouvidi E, Antsaklis A, Souka A, Kitsiou Tzeli S, Kolialexi A.(2007) Identification of nucleated red blood cells in maternal circulation: A second step in screening for fetal aneuploidies and pregnancy complications.  
*Prenat Diagn.* **27**: 150-3.
- Menke DB, Mutter GL, Page DC. (1997) Expression of DAZ, an azoospermia factor candidate, in human spermatogonia.  
*Am J Hum Genet.* **60**: 237-41
- Mesker, W.E., Ouwerkerk-Van Velzen, M.C.M., Oosterwijk, J.C., Bernini, L.F., Golbus, M.S., Kanhai, H.H.H., Van Ommen, G.J.B. & Tanke, H.J. (1998) Two-color immunocytochemical staining of gamma (g) and epsilon (var-epsilon) type hemoglobin in fetal red cells.  
*Prenat Diagn.* **18**: 1131–37.
- Mutirangura A., et al., (1998) “Epstein-Barr viral DNA in serum of patients with nasopharyngeal carcinoma”  
*Clin Cancer Res.* **4**: 665-69
- Nasis O, Thompson S, Hong T, Sherwood M, Radcliffe S, Jackson L, Otevrel T. (2004) Improvement in sensitivity of allele-specific PCR facilitates reliable noninvasive prenatal detection of cystic fibrosis.  
*Clin Chem.* **50**: 694-701.
- Nawroz H. et al. (1996) “Microsatellites alterations in serum DNA of head and neck cancer patients”  
*Nat. Med.* **2**: 1035-37
- O'Donoghue K, Choolani M, Chan J, de la Fuente J, Kumar S, Campagnoli C, Bennett PR, Roberts IA, Fisk NM. (2003) Identification of fetal mesenchymal stem cells in maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis.  
*Mol Hum Reprod.* **9**: 497-502.
- Ohashi Y, Miharuru N, Honda H, Samura O, Ohama K.(2001)

Quantitation of fetal DNA in maternal serum in normal and aneuploid pregnancies.

*Hum Genet.* **108**: 123-7.

- Oligo 4.05 Primer Analysis Software (copyright 1992 Wojciech Rychlik Published by National Biosciences, Inc. 3650 Annapolis Lane Plymouth, MN 55447 U.S.A.)
- Pertl B, Bianchi DW. (2001) Fetal DNA in maternal plasma: emerging clinical applications.  
*Obstet Gynecol.* **98**: 483-90.
- Redman CW, Sargent IL. (2003) Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review.  
*Placenta.* **24 Suppl A**: S21-7.
- Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O, et al. (1995) Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene.  
*Nat Genet.* **10**: 383-93.
- Rijnders RJ, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroede MA, Christiaens GC. (2001) Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia.  
*Obstet Gynecol.* **98**: 374-8.
- Rijnders RJ, Van Der Luijt RB, Peters ED, Goeree JK, Van Der Schoot CE, Ploos Van Amstel JK and Christiaens GC (2003) Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma.  
*Prenat Diagn.* **23**: 1042-44.
- Rijnders RJ, Christiaens GC, Bossers B, van der Smagt JJ, van der Schoot CE, de Haas M. (2004) Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma.  
*Obstet Gynecol.* **103**: 157-64.
- Roberts L, Sebire NJ, Fowler D, Nicolaides KH. (2000) Histomorphological features of chorionic villi at 10-14 weeks of gestation in trisomic and chromosomally normal pregnancies.  
*Placenta.* **21**: 678-83.

- Roberts JM, Lain KY.(2002) Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia.  
*Placenta*. **23**: 359-72.
- Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. (2000) Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma.  
*Lancet*. **356**: 1170.
- Samura O, Mihar N, Hyodo M, Honda H, Ohashi Y, Honda N, Hara T, Ohama K. (2003) Cell-free fetal DNA in maternal circulation after amniocentesis.  
*Clin Chem*. **49**: 1193-5.
- Sargent, I.L., Johansen, M., Chau, S. & Redma, C.W.G. (1994) Clinical experience: isolating trophoblasts from maternal blood.  
*Annals of the New York Academy of Sciences* **731**: 154–61.
- Saxena R, Brown LG, Hawkins T, Alagappan RK, Skaletsky H, Reeve MP, Reijo R, Rozen S, Dinulos MB, Disteche CM, Page DC. (1996) The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned.  
*Nat Genet*. **14**: 292-9.
- Saxena R, de Vries JWA, Repping S, Alagappan RK, Skaletsky H, Brown LG, Ma P, Chen E, Hoovers JMN and Page DC (2000) Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome.  
*Genomics* **67**: 256–67.
- Schmoërl, G. (1893) Pathologisch-anatomische untersuchungen ueber Publereklapmsie. Vogel, Leipzig.
- Schroder J., Tiilikainen A., de la Chapelle A. (1974) “Fetal leukocytes in the maternal circulation after delivery”  
*Transplantation* **17**: 346-54
- Sekizawa A, Kondo T, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Saito H and Okai T (2001a) Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma.  
*Clin Chem*. **47**: 1856–1858.

- Sekizawa A, Sugito Y, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Hoshi S, Saito H, Okai T. (2001b) Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum.  
*Clin Chem.* **47**: 2164-5..
- Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Sugito Y, Yukimoto Y, Otsuka J, Okai T. (2002) Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta.  
*Clin Chem.* **48**: 353-4.
- Sekizawa A, Yokokawa K, Sugito Y, Iwasaki M, Yukimoto Y, Ichizuka K, Saito H, Okai T. (2003) Evaluation of bidirectional transfer of plasma DNA through placenta.  
*Hum Genet.* **113**: 307-10.
- Slunga-Tallberg A., El-Rifai W., Keinanen M., Ylinen K., Kurki T., Kinger K., Ylikorkala O., Knuutila S. (1995) “Maternal origin of nucleated erythrocytes in peripheral venous blood of pregnant women”  
*Hum Genet.* **96**: 53-57
- Sohda S., Arinami T., Hamada H., Nakauchi H., Kubo T. (1997) “The proportion of fetal nucleated red blood cells in maternal blood: estimation by FACS analysis”  
*Prenat Diagn.* **8**: 743-752
- Sorenson G.D. et al. (1994) “Soluble normal and mutated DNA sequences from single copy genes in human blood”  
*Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **3**: 67-71
- Stanghellini I, Bertorelli R, Capone L, Mazza V, Neri C, Percesepe A, Forabosco A. (2006) Quantitation of fetal DNA in maternal serum during the first trimester of pregnancy by the use of a DAZ repetitive probe.  
*Mol Hum Reprod.* **12**: 587-9.
- Stroun M. et al. (1989) “Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients”  
*Oncology* **46**: 318-22
- Strickland S and Richards WG (1992) Invasion of the trophoblasts.  
*Cell* **71**: 355-57

- Sugito Y, Sekizawa A, Farina A, Yukimoto Y, Saito H, Iwasaki M, Rizzo N, Okai T.(2003) Relationship between severity of hyperemesis gravidarum and fetal DNA concentration in maternal plasma.  
*Clin Chem.* **49**: 1667-9.
- Swinkels DW, de Kok JB, Hendriks JC, Wiegerinck E, Zusterzeel PL, Steegers EA. (2001) Hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count (HELLP) syndrome as a complication of preeclampsia in pregnant women increases the amount of cell-free fetal and maternal DNA in maternal plasma and serum.  
*Clin Chem.* **48**: 650-3.
- Tan E.M., et al. (1966) “Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus”  
*J. Clin. Invest.* **45**: 1732-40
- Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi DW, Burton GJ. (2006) Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-placental DNA.  
*Am J Pathol.* **169**: 400-4.
- Troeger C, Holzgreve W, Ladewig A, Zhong XY, Hahn S.(2006) Examination of maternal plasma erythropoietin and activin A concentrations with regard to circulatory erythroblast levels in normal and preeclamptic pregnancies.  
*Fetal Diagn Ther.* **21**: 156-60.
- Vasioukhin V., Anker P., Maurice P., Lyautey J., Lederrey C., Stroun M. (1994) “Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia”  
*Br. J. Haematol.* **86**: 774-79
- Von Eggeling F., Michel S., Günther M., Schimmel B., Claussen U. (1997) “Determination of the origin of nucleated cells in maternal circulation by means of random PCR and a set of length polymorphisms”  
*Hum Genet.* **99**: 266-70
- Walknowska J., Conte F.A., Grumbach M.M. (1969) “Practical



and implications of foetal/maternal lymphocyte transfer”

*Lancet* **1**: 1119-22

- Wataganara T, LeShane ES, Farina A, Messerlian GM, Lee T, Canick JA, Bianchi DW.(2003) Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18.  
*Hum Genet.* **112**: 204-8.
- Wataganara T, Chen AY, LeShane ES, Sullivan LM, Borgatta L, Bianchi DW, Johnson KL.(2004) Changes of cell-free fetal DNA in maternal plasma after elective termination of pregnancy.  
*Clin Chem.* **51**: 217-9.
- Zheng Y.L., De Maria M., Zhen D.K., Vadnais T.J., Bianchi D.W. (1995) “Flow sorting of fetal erythroblast using intracytoplasmic antifetal haemoglobin: preliminary observations on maternal samples”  
*Prenat Diagn* **15**: 897-99
- Zheng Y.L., Zhen D.K., De Maria M., Berry S.M., Wapner R.J., Evans M.I., Copeland D., Williams J.M., Bianchi D.W. (1997) “Search for the optimal fetal cell antibody: results of immunophenotyping studies using flow cytometry”  
*Hum Genet.* **100**: 35-42
- Zhong XY, Burk MR, Troeger C, Jackson LR, Holzgreve W, Hahn S. (2000a) Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses.  
*Prenat Diagn.* **20**: 795-8.
- Zhong XY, Holzgreve W, Li JC, Aydinli K, Hahn S. (2000b) High levels of fetal erythroblasts and fetal extracellular DNA in the peripheral blood of a pregnant woman with idiopathic polyhydramnios: case report.  
*Prenat Diagn.* **20**: 838-41.
- Zhong XY., Laivuori H., Livingstone JC., Ylikorkala O., Sibai BM., Holzgreve W., Hahn S. (2001) Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia.  
*Am J Obstet Gynecol.* **184**: 414-9

- Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. (2002) The levels of circulatory cell free fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia.  
*Hypertens Pregnancy* **21**: 77-83.
- Zhong XY, Steinborn A, Sohn C, Holzgreve W, Hahn S. (2006) High levels of circulatory erythroblasts and cell-free DNA prior to intrauterine fetal death.  
*Prenat Diagn.* **26**: 1272-3.
- Zimmermann B, El-Sheikhah A, Nicolaides K, Holzgreve W and Hahn S (2005) Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma.  
*Clin Chem.* **51**: 1598–04.